

**Über das Absorptionsverhalten von Kulturfiltraten
humaner, boviner und aviärer Tuberkelbakterien
nach elektrophoretischer Zerlegung in unterschiedliche
Fraktionen**

Marianne Hamacher

Frankfurt 1964

Aus dem P a u l - E h r l i c h - I n s t i t u t
Staatliche Anstalt für experimentelle Therapie
Frankfurt am Main

Damaliger Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c.R.Prigge
Derzeitiger k. Direktor: Prof.Dr.G.Heymann

ÜBER DAS ABSORPTIONSVERHALTEN VON KULTURFILTRATEN
HUMANER, BOVINER UND AVIÄRER TUBERKELBAKTERIEN NACH
ELEKTROPHORETISCHER ZERLEGUNG IN UNTERSCHIEDLICHE
FRAKTIONEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Marianne Hamacher
aus Mainz/Rhein

Frankfurt/M. 1963



Dekan : Prof.Dr.J.Frey
Referent : Prof.Dr.G.Heymann
Korreferent: Prof.Dr.K.Herzberg
Prof.Dr.G.Schoop

Mündliche Prüfung : 9.1.64

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Allgemeiner Teil	5
II. Eigene Untersuchungen - Methodik	13
Untersuchte Stämme	13
Kulturelle Wuchsformen	13
Kulturverfahren	14
Nährbodenzusammensetzung	15
Gewinnung der Tuberkulinmuttersubstanz .	15
Ultrafiltration der Tuberkulin- muttersubstanz	16
Elektrophoretische Auftrennung des TMS-Ultrakonzentrats	16
Spektrophotometrische Untersuchung des elektrophoretisch aufgetrennten TMS- Ultrakonzentrats	18
Spezielle Versuchsanordnung	20
Allgemeine und spezielle Probleme bei der spektrophotometrischen Untersuchung.	23
Chemische Charakterisierung des elek- trophoretisch zerlegten Ultrakonzentrats	24

	Seite
III. E r g e b n i s s e	
A. Spektrophotometrisches Verhalten der Hauptfraktionen	25
B. Vergleich aller Einzelfraktionen bei konstanten Wellenlängen	50
IV. B e s p r e c h u n g der Ergebnisse .	61
V. Z u s a m m e n f a s s u n g	64
Literaturverzeichnis	65

I. Allgemeiner Teil

Tuberkulin - zellfreies, hitzedenaturiertes Kulturfiltrat von Tuberkelbakterien - wurde bereits 1890 von Robert Koch als biologisch wirksame Substanz beschrieben. Seit der Einführung des Tuberkulinhauttests durch Pirquet im Jahre 1907 hat es einen festen Platz im Rahmen der klinischen Tuberkulosedagnostik, bei der Erfassung von Infektionsquellen, und der Aufklärung von epidemiologischen Zusammenhängen. Daran hat sich bis heute trotz der wesentlichen Verbesserung der übrigen diagnostischen Möglichkeiten nichts geändert. Die Bedeutung des Tuberkulins für die Human- und Veterinärmedizin wird bis in die jüngste Zeit immer wieder betont (WEYL (71), BALLOWITZ (6), STÖCKL (66,67), FREERKSEN (16), ZUNIGER (72)). Sein einzigartiger Wert besteht darin, dass es vom nichtinfizierten Organismus praktisch reizlos vertragen wird, während der tuberkulös infizierte auf die kutane bzw. intrakutane Anwendung des Tuberkulins mit lokalen Entzündungserscheinungen reagiert. Ein gutes diagnostisches Mittel soll zu stets gleichartigen und eindeutigen Ergebnissen führen, d.h. für das Tuberkulin, es soll neben einer konstanten Wirksamkeit bei möglichst gleichbleibender Zusammensetzung eine hohe Spezifität aufweisen.

Die erste Forderung ist seit der Einführung der Wertbemessung nach dem " Allgemeinen Standardprinzip " nach PRIGGE und DÖHMEN (45) erfüllt.

Eine gleichbleibende Zusammensetzung kann hingegen bei biologischen Produkten nur innerhalb bestimmter Grenzen erreicht werden. Beim Tuberkulin z.B. müssen hierfür auch bei normierten äusseren Bedingungen auftretende unvermeidbare Schwankungen des Kulturverhaltens des Ausgangsstammes und bei der Aufarbeitung der Kulturfiltrate verantwortlich gemacht werden. Nach STÖCKL (67) spielt hierbei die der thermischen Aufspaltung in niedermolekulare Fraktionen fol-

gende und nicht steuerbare Aneinanderlagerung der Spaltprodukte zu grösseren Peptiden eine Rolle.

Wichtiger noch als eine gleichbleibende Zusammensetzung ist jedoch die Forderung nach einer hohen Spezifität, die so gross sein soll, dass möglichst nur homologe Infektionen angezeigt werden und bei heterologen keine oder nur sehr schwache Reaktionen hervorgerufen werden. Und gerade diese Eigenschaften besitzen unsere derzeitigen handelsüblichen Tuberkuline noch nicht (KLEINSCHMIDT (29), SCHUSTER (53), SEIBERT und MORLEY (54), JENSEN und LIND (23), GÖTZE (18), BALLOWITZ (6), MUSER und NASSAL (38)). Infektionen mit humanen oder bovinen Tuberkelbakterien, sowie Impfallergien durch den BCG-Stamm lassen sich auch durch homologe Tuberkulinpräparate nicht sicher unterscheiden, wie in der Tabelle von GREEN (19) nachstehend wiedergegeben. Besonders die eingehenden Untersuchungen

Meerschwein- chen sensib. mit	Mykobakterienart, von der das Tuberkulin stammt					
	M.phlei	Humane Tbb.	Bovine Tbb.	Aviäre Tbb.	Johne Bac.	BCG
M.phlei	1	150	150	100	50	150
Humane Tbb.	150	1	0,5	20	30	2
Bovine Tbb.	150	1	1	40	30	2
Aviäre Tbb.	100	20	40	1	3	40
Johne Bac.	50	10	10	3	1	10
BCG	150	1	0,5	20	30	1

Tabelle 1 : Die Spezifität verschiedener Tuberkulinpräparate (nach GREEN). Die Ziffern in dieser Tabelle bezeichnen die Anzahl Gewichtseinheiten von heterologem Tuberkulin, die notwendig waren, um Hautreaktionen von derselben Grösse hervorzurufen, wie sie mit homologem Tuberkulin erzeugt wurden.

von LIND (31,32) haben neben den Arbeiten von zahlreichen anderen Autoren eindrucksvoll nachgewiesen, dass zwischen den verschiedenen Erregern, die ausser den Tuberkelbakterien zu der Klasse der Mykobakterien gehören, zahlreiche Antigengemeinschaften bestehen, die in der Praxis des Tuberkulinhauttests zu recht störenden Kreuzreaktionen führen können. Auf diese Tatsache wird im Schrifttum immer wieder hingewiesen.

Breitangelegte Nachforschungen von PALMER (' 42), PALMER und PETERSEN (40,41) sowie EDWARDS und PALMER (15) über die geographische Verteilung positiver Tuberkulinreaktionen in verschiedenen Staaten der USA haben gezeigt, dass bei vergleichbarer Erkrankungshäufigkeit an Tuberkulose erhebliche Unterschiede im Verhalten der Tuberkulinreaktion bestehen, die von den Autoren durch Kreuzreaktionen mit einem anderen unbekannten Erreger begründet werden. Von den Philippinen sind ähnlich gehäufte " falsch " positive Tuberkulinhautreaktionen bekannt geworden. Auch Infektionen mit anderen Erregern, die nicht zur Klasse der Mykobakterien gehören, wie Histoplasmose, Brucellose, Aktinomykose, sowie die Dermatitis nodosa der Rinder werden immer wieder neben Infektionen mit den saprophytären Keimen aus der Mykobakteriengruppe für die Unspezifität der Tuberkulinreaktion beschuldigt. JONES und Mitarbeiter (24,25,26) berichteten 1953 aus den USA über 50% unspezifisch positive Tuberkulinhautreaktionen bei Rindern, die bei der Obduktion keinerlei Zeichen einer Tuberkuloseinfektion aufwiesen. Auch sie führen als Ursache hierfür Infektionen mit Paratuberkelbakterien, aviären oder eng damit verwandten Keimen an. PATERSON (43) berichtete 1956 ebenfalls über entsprechende Reaktionen bei Rindern, MUSER und NASSAL (38) über die gleichen Vorkommnisse bei Pferden. GÖTZE (18) konnte allerdings noch 1950 für Deutschland eine Sicherheit von 96 - 98% für die Tuberkulinhautreaktion bei Rindern anführen.

MEISSNER (33) glaubt, dass mit zunehmender Bekämpfung der echten Tuberkelbakterien als Folge der geringeren Durchseuchungsimmunität atypische Mykobakterien an deren Stelle rücken könnten. Das bedeutet, dass in der Folge mit der stän-

digen relativen (und absoluten ?) Zunahme " falsch " positiver Tuberkulinreaktionen gerechnet werden muss. Auch ZUNKER (72) weist diese Gedankengänge nicht von der Hand. BALLOWITZ (6) diskutiert als Pädiater das Vorkommen von Infektionen mit atypischen (chromogenen) Mykobakterien, allerdings nur für Einzelfälle.

Übereinstimmend werden also in der Human- und Veterinärmedizin Stimmen laut nach der Einführung von " Tuberkulinen " aus den verschiedenen pathogenen und apathogenen Mykobakterien bzw. nach der Isolierung der jeweils spezifischen Antigene aus den Kulturfiltraten der verschiedenen Erreger (MICKE (34), BALLOWITZ (6), STÖCKL (67), FREERKSEN (16), POLLOK, SUTHERLAND, D'ARCX HART (44), ZUNKER (72), OPRESCU (39)).

Die Untersuchung der antigenetischen Zusammensetzung der Kulturfiltrate der verschiedenen Tuberkuloseerreger - des Ausgangsmaterials für die Tuberkulinherstellung - dient jedoch nicht nur dem Ziel der Erhöhung der Spezifität der Tuberkulinhautreaktion. Sie schafft ausserdem durch die Isolierung bestimmter Antigene die Grundlage für eine differenzierte serologische Diagnostik der Tuberkulose.

Schliesslich ist durch die Prüfung des Immunisierungsvermögens der verschiedenen Partialantigene eine Verbesserung der Methoden der Tuberkuloseschutzimpfung zu erhoffen.

Die vorliegende Arbeit steht im Rahmen solcher breit-angelegten Untersuchungen, die im Paul-Ehrlich-Institut in Frankfurt am Main durchgeführt werden und u.a. der Aufklärung der antigenetischen Grenzen zwischen den verschiedenen Mykobakterientypen dienen.

Aufgabe dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob das von MICKE (34) für die Kulturfiltrate des Stammes Tb 1⁺ (Typus humanus) beschriebene Absorptionsverhalten mit dem von anderen Tuberkelbakterientypen identisch ist oder ob sich stamm- oder typspezifische Unterschiede ergeben.

Im folgenden Kapitel soll an Hand der Literatur skizziert werden, welche Untersuchungen zur Bestimmung der Inhaltsstoffe von Tuberkelbakterienkulturfiltraten durchgeführt wurden und zu welchen Ergebnissen man seither gelangt ist.

Bereits kurz nach der Entdeckung des Tuberkulins haben HAMMERSCHLAG (20), ARONSON (3), BENDIX (8) in den Jahren zwischen 1891 bis 1901 Untersuchungen zur Aufklärung der chemischen Zusammensetzung des Tuberkulins durchgeführt und dabei Eiweisskörper, wachsartige Substanzen und Kohlehydrate nachweisen können. Lipide wurden 1927 bis 1929 von ANDERSON (1,2) näher beschrieben. In der Folgezeit haben sich zahlreiche Autoren mit der Biochemie der Tuberkelbakterienkulturfiltrate beschäftigt. Diese Arbeiten wurden in den Zusammenstellungen von ROULET und BRENNER (48), PRIGGE und HEYMANN (47), SEIBERT (59,62), BOYDEN und SORKIN (13) u.a. ausführlich abgehandelt.

Zur Untersuchung gelangten erhitzte und unerhitzte Kulturfiltrate, die mit Ammonsulfat (SEIBERT, PEDERSEN, TISELIUS (56), BEVILAQUA und McCARTER (9)), Trichloroessigsäure (SEIBERT (55,57,60)), Äthylalkohol bei niederen Temperaturen (SEIBERT (61)), absolutem Methylalkohol (DADDI und CATTANEO (14)), Tannin (SCHUBERT (52)), und Phosphorwolframsäure gefällt und anschliessend in der freien oder Papier-Elektrophorese analysiert wurden. Ausserdem wurden Bausteinanalysen durchgeführt mit hydrolytischer Spaltung der Eiweisskörper bis zu den Aminosäuren (JONES (24,25,26)). In jüngster Zeit erfolgten Fraktionierungen der unerhitzten Kulturfiltrate auch durch elektrophoretische Trennung in der Agar-Elektrophorese, sowie die Gel-filtration mit Sephadex (STÖCKL, KROCZA, MATHOIS (69)). Trotz der Vielzahl der Untersuchungen hat die Verschiedenartigkeit der angewandten Methoden, sowie die Tatsache, dass fast jeder Untersucher noch weitere Modifikationen einführt, zur Folge, dass die gewonnenen Ergebnisse nur bedingt miteinander verglichen werden können.

Im Wesentlichen wurden folgende chemische Substanzen im Kulturfiltrat von Tuberkelbakterien nachgewiesen:

1. Lipoide

Sie werden in Fette, Wachse und Phosphatide unterteilt. Nach STÖCKL (67), ROULET (49) und BLOCH (10) u.a. sind sie die Ursache der typischen Tuberkelbildung und bewirken das Zustandekommen der verzögerten Allergiereaktion. Jedoch soll nur einzelnen Fraktionen ein gewisses Sensibilisierungsvermögen zukommen. Wesentliche Bestandteile der Lipoide sind die Mykolsäuren, die in humanen und bovinen Bakterien in gleichartiger Weise vorkommen, mit deren Hilfe man aber andere Mykobakterien abzutrennen hofft. Die Wachse setzen sich aus Lipopolysaccharidkomplexen zusammen, die aus Mykol- und Fettsäuren bestehen und mit stickstoffhaltigen, phosphorylierten Polysacchariden verestert sind. Ausserdem wurden peptidartig gebundene Aminosäuren nachgewiesen. Die Phosphatide bestehen aus Fettsäuren mit einer oder mehreren Methylverzweigungen. Die wichtigsten Verbindungen dieser Art sind die Tuberkulostearinsäure, die Phthionsäure und die Mycocerosinsäure, die pathogen und sensibilisierend wirken und die Bildung von Epitheloidzelltuberkeln auslösen können (PRIGGE (46)). Tuberkulostearinsäure und Phthionsäure wurden seither in anderen Keimen noch nicht nachgewiesen. ANDERSON (2) und ASSELINEAU (4) unterscheiden die Wachse aufgrund verschiedener Löslichkeit in A, B, C und D-Wachse. Nach ASSELINEAU und LEDDERER (5) hat die D-Fraktion als wesentlichen Bestandteil eine Eiweisskomponente. Der Cordfaktor wurde von BLOCH (10) aus der C-Fraktion isoliert und soll mit der Virulenz und der Toxizität in engster Verbindung stehen.

2. Kohlehydrate

Die Tuberkulopolysaccharide kommen an Protein, Nukleinsäuren und Lipoide gekoppelt vor. Wieviel verschiedene Polysaccharide das Tuberkelbakterium synthetisiert, ist bis heute

nicht sicher bekannt. Nach BOYDEN und SORKIN (13) handelt es sich bei den wasserlöslichen Polysacchariden der Kulturfiltrate um Bruchstücke der durch Hydrolyse gewonnenen fettlöslichen Polysaccharide. Sicher nachgewiesen sind Glykogen und zwei andere Polysaccharide, die als Polysaccharid I und II von SEIBERT, PEDERSEN, TISELIUS (56) und SEIBERT (61), sowie von KENT (28) beschrieben worden sind. Das Polysaccharid I wurde elektrophoretisch und chemisch bestimmt und enthält Eiweisstickstoff, Arabinose und Mannose, sowie Hexosamin. Das Polysaccharid II enthält als Hauptbestandteil Glukose, nach Verseifung wurden ausserdem Glukosamin und 8% Lipoid frei. Von SORKIN und BOYDEN (65) wurde ein ähnliches Kohlehydrat mit einem geringen Lipoidgehalt im Kulturfiltrat eines virulenten humanen Tuberkelbakterienstammes nachgewiesen. Es wird behauptet, die Polysaccharide seien genus- aber nicht speciesspezifisch. SOCKEMÜLLER (11) fand unter anderem unterschiedliche Glykogenfraktionen mit einem Molekulargewicht zwischen 800 und 33 Mill.

3. Proteine

Von SEIBERT (54,55) konnten durch Fraktionierung der Tuberkuloproteine mittels Fällung bei niederen Temperaturen drei auch elektrophoretisch differenzierbare Proteinfractionen A, B und C isoliert und untersucht werden. Die Benennung nach Buchstaben erfolgte nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese, wobei das Protein A mit einem Molekulargewicht von 32 000 die geringste Wanderungsgeschwindigkeit aufweist. Die stärkste Tuberkulinwirksamkeit kommt dem Protein A zu; das Protein B wird von mancher Seite für ein Bruchstück von Protein A gehalten, während das Protein C höhermolekular ist und durch seine Löslichkeit, sowie durch sein Absorptionsverhalten im Ultraviolettbereich unterscheidbar sein soll. Nach den Untersuchungen von MICKE und GÖING (36) kam jedoch den von MICKE (34) elektrophoretisch isolierten Proteinfractionen aus Tuberkulinmuttersubstanz jeweils eine eigene serologische

Spezifität zu. Die Eiweisse der Tuberkelbakterien gelten ebenfalls als wichtiger Gestaltungsfaktor der Tuberkulose, da sie spezifische Immunisierungsvorgänge auslösen und die Allergie unterhalten sollen. Neuerdings konnten von STÖCKL und MATHOIS (68), sowie KASUGA und MAGITANI (27) und MORIKAWA (37) aus den Eiweisskörpern Peptide mit intrakutaner Tuberkulinwirksamkeit isoliert werden.

SEIBERT, FIGUEROA und DUFOUR (64) beschrieben 1955 neben den oben erwähnten Proteinen eine elektrophoretisch langsam wandernde Fraktion, die zu ungefähr gleichen Teilen aus Eiweiss und Kohlehydrat bestand und die sie deshalb Glykoprotein nennen. Sie enthält einen relativ hohen Anteil von α -Diaminopimelinsäure.

Die einzelnen Proteine unterscheiden sich neben ihrer verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit durch ihre verschiedene Löslichkeit und durch ihre unterschiedliche Sedimentation in der Ultrazentrifuge.

4. Nukleinsäuren

In den Kulturfiltraten von Tuberkelbakterien kommen ausserdem noch an Protein gebundene oder freie Nukleinsäuren vor, denen kein biologisches Interesse zukommen soll.

II. Eigene Untersuchungen

(Methodik)

Die Kulturfiltrate folgender Tuberkelbakterienstämme aus der Stammhaltung des Paul-Ehrlich-Instituts wurden untersucht:

1. Erreger vom Typus humanus:

- a) Stamm Tb 1⁺ (virulent)
- b) Stamm Tb 29 = Stamm H 37 Rv (virulent)

2. Erreger vom Typus bovinus:

- a) Stamm Tb 39 = Vallée (virulent) ¹⁾
Dieser Stamm wird bei der Herstellung des Rinder-einheitstuberkulins verwendet.
- b) Stamm Tb 40 = Ravenel (virulent) ²⁾

3. Erreger vom Typus gallinaceus:

- a) Stamm Tb 9
Dieser Stamm hat seine Virulenz auf künstlichem Nährboden im Laufe der Jahre weitgehend verloren.
- b) Stamm Tb 56 (virulent)

Sämtliche untersuchten Stämme gehören seit vielen Jahren zur Stammsammlung des Paul-Ehrlich-Instituts. Sie wurden in 6-wöchigen Abständen auf festem PH - VII - Einährboden passagiert (siehe S.15).

Kulturelle Wuchsformen der untersuchten Stämme

1. Humane Erreger

Eugones, trockenes, streuselkuchenähnliches, gelb-bräunliches Wachstum der Kolonie. Teilweise auch feucht-glänzende Kolonieform.

¹⁺²⁾ Der Stamm wurde uns freundlicherweise im Jahre 1952 von Herrn Prof. Meyn, Warthausen, überlassen.

2. Bovine Erreger

Dysgonies Wachstum. Einzelkolonien feucht, hellgelb, teilweise glänzend.

3. Aviäre Erreger

Feuchtes Wachstum. Einzelkolonie kugelig. Grössere Wachstumsgeschwindigkeit als bei den anderen beiden Typen.

Kulturverfahren

Von den untersuchten Stämmen wurde in 100-ccm-Erlenmeyerkolben eine Oberflächenkultur auf flüssigem, gepuffertem, vollsynthetischem Nährsubstrat nach PRIGGE-HELMERT (22), künftig als PH VII bezeichnet, angelegt. Nach zwei oder mehr Vorkulturen wurde hiervon der gleiche Nährboden in Fernbachkolben à 1 Liter beimpft. Die Bebrütung erfolgte einheitlich 8 Wochen bei 37 Grad C. Die verschiedene Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Keintypen wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit bewusst nicht berücksichtigt. Der Verschluss der Kolben erfolgte mit Aluminiumfolien.

Zusammensetzung des flüssigen Nährbodens nach PRIGGE-HELMERT
(PH VII)

Bei diesem Nährboden handelt es sich um einen voll-synthetischen, flüssigen Nährboden mit hoher Pufferungskapazität. Alleinige Stickstoffquelle ist sein Asparagingehalt von 0,4%. Das Ausgangs-pH liegt bei 7,2. Im Einzelnen ist seine Zusammensetzung folgende:

1. Acidum citricum	2,0	g
Monokaliumphosphat, 1. Portion	0,4328	g
Magnesiumsulfat (+7 H ₂ O)	0,5	g
Eisenammoncitrat	0,05	g
Aqua bidest.	100,00	ccm
2. Asparagin	4,0	g
Aqua bidest.	100,00	ccm
3. 10-n Natronlauge zur Einstellung des erforderlichen pH 7,2		
4. Monokaliumphosphat, 2. Portion	0,0672	g
Dinatriumphosphat	0,8450	g
Aqua bidest.	50,00	ccm
5. Glyzerin	60,00	ccm
6. Aqua bidest	ad 1000,00	ccm
7. Sterilisieren durch 30-minütiges Erhitzen im strömenden Dampf an drei aufeinander folgenden Tagen.		

Gewinnung der Tuberkulinmuttersubstanz

Nach Ablauf der Bebrütungsdauer von 8 Wochen wurden die Bakterienoberflächenkulturen mittels Filtration durch ein weitporiges Papierfilter ohne Absaugen von der Kulturflüssigkeit getrennt und das Kulturfiltrat in 10 Liter fassende Saugflaschen aufgenommen. Dann wurde die Entkeimung im Seitz-Filtrationsgerät EK angeschlossen. Die Entkeimungsschichten wurden im Filter jeweils mehrmals mit Aqua bidest. vorgewaschen, da sonst wasserlösliche Filterschichtbestandteile in das Kulturfiltrat gelangen. Eine Adsorption wirk-

samer Inhaltsstoffe des Kulturfiltrats kann nicht verhindert werden (HAWKINS et al. (21), THURSTON et al. (70)).

Das u n e r h i t z t e , k e i m f r e i e K u l t u r -
f i l t r a t von Tuberkelbakterien wird in der Folge als
T u b e r k u l i n m u t t e r s u b s t a n z (T M S) be-
zeichnet.

Von jedem TMS-Ansatz wurden zur Kontrolle des Freiseins
von Tuberkelbakterien je 3 Meerschweinchen mit 3 ccm TMS
intraperitoneal injiziert.

Ultrafiltration der Tuberkulinmuttersubstanz

Zur Anreicherung der höhermolekularen Inhaltsstoffe
wurde die Tuberkulinmuttersubstanz der Ultrafiltration un-
terworfen. Hierzu wurde das Druckfiltrationsgerät der Mem-
branfilter GmbH. Göttingen mit der Filterschicht Lsg. 60
verwandt. Dabei werden Stoffe bis zu einem Molekulargewicht
von etwa 10000 durchgelassen, höhermolekulare bleiben auf dem
Filter zurück und bilden das TMS-Ultrakonzentrat. Die Ultra-
filtration erfolgte bei einer Temperatur von +4 Grad C.
Der Filterrückstand wurde in 5-10 ccm Aqua dest. aufgenommen
und nach Lösung in der Regel mit soviel Teilen des Natrium-
Phosphat-Citrat-Puffers versetzt, dass dessen Endkonzentra-
tion dem Elektrophoresepuffer entsprach. Durch eine Filtermem-
bran konnten bei humaner und boviner TMS jeweils 1-1,5 Liter,
bei aviären Filtraten wegen der geringeren Konzentration an
Substanzen, die auf dem Filter zurückgehalten werden, jeweils
3-5 Liter filtriert werden.

Elektrophoretische Auftrennung des TMS-Ultrakonzentrats

Statt der weitverbreiteten chemischen Fällungsmetho-
den wurde die elektrophoretische Auftrennung des TMS-Ultra-
konzentrats gewählt. Sie hat sich unter den Methoden der
Eiweisschemie als besonders schonend erwiesen und gleich-
zeitig zu guten Trennungsergebnissen geführt. Im Hinblick
auf die spätere Prüfung der biologischen Eigenschaften der

TMS schien dieser Weg am meisten erfolgversprechend, da die Gefahr der Denaturierung gering ist.

Die präparative Trennung des TMS-Ultrakonzentrats erfolgte nach dem Prinzip von GRASSMANN und HANNIG mit Hilfe des Elektrophoreseapparates Modell CP der Firma Beckman Instruments. Das TMS-Ultrakonzentrat läuft über einen vertikal aufgehängten Papierbogen und wird dabei durch ein dazu querverlaufendes elektrisches Feld aufgetrennt. Die hierbei entstehenden Fraktionen werden in 32 Reagenzglasröhrchen aufgefangen, die mittels eines steuerbaren Fraktionswechslers ausgetauscht werden können. Zur Untersuchung wurde Elektrophoresepapier Nr. 400-235 der Firma Beckman benutzt.

Eine befriedigende Auftrennung gelang unter Benutzung eines Natrium-Phosphat-Citrat-Puffers nach BOCKMÜLLER (12) mit folgender Zusammensetzung :

Lösung A : 89 g sekundäres Natriumphosphat nach Sörensen werden in 5 Liter Aqua dest. gelöst.

Lösung B : 15 g Zitronensäure werden in 250 ccm Aqua dest. gelöst. Man gibt dann 200 ccm n-Natronlauge hinzu und füllt das Ganze auf 1000 ccm mit Aqua bidest. auf.

Die Mischung von 5 Litern der Lösung A mit 1,5 Litern der Lösung B ergeben 6,5 Liter des gebrauchsfertigen Puffers. Für die eigenen Untersuchungen erwies sich allerdings eine Verdünnung des originalpuffers mit Aqua bidest. auf 1/12 als erforderlich. Um einer möglichen bakteriellen Verunreinigung vorzubeugen, wurde der Pufferlösung eine 10%ige Phenollösung bis zu einer Endkonzentration von ca. 0,2% zugesetzt. Das pH der fertigen Lösung betrug 7,8. Mit der elektrophoretischen Trennung wurde erst dann begonnen, wenn die Stabilisierung des elektrischen Feldes erreicht war. Da hierzu mehrere Stunden erforderlich waren, erwies es sich als zweckmässig, das Gerät bereits am Vorabend bis auf den Substanzlauf in Betrieb zu setzen. Es wurde mit 40-50 mA bei einer Spannung von 700-800 V gearbeitet, da bei höheren Stromstärken die schnellsten Fraktionen seitlich in den

allgemeinen Pufferstrom auswandern und somit nicht auffangen werden können. Durchschnittlich gelangten jeweils 8-10 ccm des TMS-Ultrakonzentrats zur Auftrennung. Für die Trennschärfe war es wichtig, nicht mehr als 1-1,2 ccm des TMS-Ultrakonzentrats in der Stunde zufließen zu lassen. Entsprechend dauerte eine elektrophoretische Untersuchung 7-10 Stunden. Durch eine Kühlanlage wurde die Puffertemperatur bei +4 bis 8 Grad C gehalten. Nach Versuchsende wurde der Trennungsvorhang sofort bei 110 Grad C im Trockenschrank getrocknet. Die 32 Fraktionsröhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei +4 Grad C aufbewahrt.

Die normierten Versuchsbedingungen waren für die Ultrakonzentrate der v e r s c h i e d e n e n Stämme nicht in gleicher Weise optimal. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde jedoch bewusst auf Modifikationen in der Versuchsanordnung verzichtet, obwohl damit im Einzelfall sicher eine bessere Abtrennung der Fraktionen untereinander hätte erzielt werden können.

Spektrophotometrische Untersuchung des elektrophoretisch aufgetrennten TMS-Ultrakonzentrats

Die spektrophotometrische Untersuchung der elektrophoretisch gewonnenen Einzelfraktionen erfolgte im Hinblick auf etwaige typspezifische Unterschiede im Absorptionsverhalten der von uns untersuchten Stämme.

Ausserdem bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, die aufgrund ihres spezifischen spektralen Verhaltens zusammengehörigen benachbarten Röhrchen bereits vor einem chemischen Nachweisverfahren oder anstatt eines solchen zu erkennen und für weitere Untersuchungen sinnvoll zu vereinigen. Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, dass nur 3 ccm der zu untersuchenden Lösung oder eine Verdünnung davon für die Messung benötigt werden, die zudem für andere Versuche wieder verwendet werden können.

Das Wesen der absorptionsspektrophotometrischen Un-

tersuchung besteht in der Änderung von Lichtintensitäten bestimmter Wellenlängen beim Durchtritt durch die zu untersuchende Lösung. Die Lösung eiweisshaltiger Substanzen zeigt im Ultraviolettbereich von 250 - 320 m μ (BEAVEN (7)) einige charakteristische Absorptionsmaxima. Ihr Vorhandensein ist an die Anwesenheit aromatischer Aminosäuren wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan im Eiweissmolekül gebunden. Sie beruhen auf dem Vorliegen chromophorer Gruppen, die in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Die genaue Lage der Aminosäuren- bzw. Eiweissabsorptionsmaxima innerhalb der Wellenlängenskala kann nicht generell angegeben werden, da sie eine grosse Abhängigkeit von den benutzten Lösungsmitteln zeigen, wie weiter unten an mehreren Beispielen dargestellt werden wird. Es besteht ausserdem eine deutliche Abhängigkeit der Maxima vom pH der untersuchten Lösung (SANDRITTER (50), SCHAUENSTEIN (51)). Andere Faktoren, die die Extinktion und die Lage der Absorptionsbanden einer Lösung beeinflussen, sind der Grad der Dissoziation, das Vorliegen von Assoziationen, Zusätze von Salzen oder Eiweiss sowie Wechselwirkungen mit Lösungen hoher Pufferungskapazitäten. Befinden sich in einer Lösung mehrere absorbierende Substanzen, so addieren sich deren Extinktionen, zum Teil jedoch mit gewissen Abweichungen. Natürlich ist auch die Verwendung streng monochromatischen Lichtes, d.h. die bei der Messung benutzte Spaltbreite des Apparates von besonderem Einfluss. Die Änderung des Brechungsindex mit der Konzentration ist als Fehlerquelle nach KORTÜM (30) hingegen zu vernachlässigen. Es ist ausserdem wichtig, die Temperatur der Mess- und Bezugslösung auf ± 1 Grad C konstant zu halten, da sonst die Absorptionsbanden in Höhe, Form und Lage eine Änderung erfahren können. Dabei führt eine Erhöhung der Temperatur zu Verschiebungen der Bande ins Langwellige (Rot- oder Rechtsverschiebung). Auch kleinste Spuren von Verunreinigungen können das Messergebnis ebenfalls erheblich beeinflussen und eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse unmöglich machen. Es ist deshalb für reine Vergleichsmessungen, wie sie die nachfolgenden U_n Untersuchungen ausschliesslich darstellen, äusserst

wichtig, die Versuchsanordnung und ihre äusseren Bedingungen möglichst konstant zu halten. Auch Lichtstreuungseffekte können bei kolloidal gelösten Substanzen Anlass zur Fehlbeurteilung werden, besonders im kurzwelligen Bereich. In unserem Fall lag der Schwerpunkt der Überlegungen auf der Relation der Messwerte innerhalb der einzelnen Fraktionen und nicht auf deren absoluter Höhe.

Spezielle Versuchsanordnung

Die Messungen wurden mit dem registrierenden Spektrophotometer DK 2 der Firma Beckman durchgeführt. Es arbeitet nach dem Doppelstrahlprinzip und misst das Energieverhältnis der aus Proben- und Vergleichskanal auf den Empfänger fallenden Strahlen. Dabei wird das von der Lichtquelle ausgesandte Licht durch eine rotierende Lochscheibe in Wechsellicht mit einer Frequenz von 400 Hz zerhackt, um es später als Wechselstromsignal verstärken zu können. Diese Zerhackfrequenz ergibt ein optimales Signal-Rauschverhältnis bei Messung mit der Bleisulfidzelle. Der polychromatische Lichtstrahl gelangt aus dem Zerhacker in den Monochromator. Aus diesem kommt das nunmehr monochromatische Licht in den Probenraum, in dem ein System rotierender Spiegel den Lichtstrahl abwechselnd durch den Proben- und Vergleichskanal sendet. Die von den beiden Kanälen durchgelassene Strahlung fällt auf den Empfänger (Photomultiplier oder Bleisulfidzelle). Dessen Signal wird als Wechselspannung auf Verstärker gegeben. Durch einen synchron gesteuerten Kommutator wird das verstärkte Signal abwechselnd auf den Proben- oder Vergleichs-demodulator gelegt.

Wir registrierten die Extinktionen der Proben bei einer Empfindlichkeitseinstellung von 300 und einer Zeitkonstanten (Dämpfung) von 0,2. Die Spektren im Ultraviolettbereich schrieben wir mit der Wasserstofflampe und 20facher Sekundärelektronenvervielfachung. Die Spektren im sichtbaren Bereich wurden mit der Wolframlampe und der Bleisulfidzelle aufgenommen. Bei dem benutzten Spektrophoto-

meter handelt es sich um ein Gerät mit nichtlinearer Wellenlängeneinteilung. Die Extinktionen werden fortlaufend gemessen und gleichzeitig registriert. Hierbei kommt es zu einer Darstellung der Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Wir wählten die Registrierung für den Extinktionsbereich von $-0,3$ bis $+0,7$, entsprechend der Einstellung $0 - 200$ am Gerät. Die auf dem Kurvenblatt auf der Ordinate angeführten Zahlen sind nicht die Extinktionswerte, sondern die Skalenwerte des linear bis 100 aufgeteilten Bogens.

Von allen Röhrrchen des aufgetrennten TMS-Ultrakonzentrats wurde die vorliegende Konzentration unverdünnt gemessen. Um zu vergleichbaren Kurven zu gelangen, wurde für Spektren, die bei der Einstellung $A\ 0 - 200$ nicht mehr auf dem Papier zur Aufzeichnung gebracht werden konnten, da ihr Messbereich mehr als 100 Skalenteile betrug, keine günstigere Einstellung des Geräts ermittelt. Diese Röhrrchen mit höherer Konzentration wurden vielmehr so verdünnt, dass bei der einmal gewählten Einstellung ihr gesamtes Absorptionsspektrum zur Darstellung kam. Um jedoch einen Einblick in das wechselnde Mengenverhältnis der einzelnen Komponenten zu erhalten, wurden die Skalenwerte der konzentrierten Ausgangslösung errechnet. Hierbei wurde die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes für den untersuchten Bereich, d.h. das Bestehen einer linearen Beziehung zwischen Konzentration und Extinktion unterstellt, wenn auch verschiedentlich Abweichungen zwischen Messwert und Konzentration der Lösung zur Darstellung kamen. Grundsätzlich wurden die Ultrakonzentrate aller untersuchten Stämme mehrmals der Elektrophorese und der spektrophotometrischen Untersuchung unterworfen. Damit sollte einerseits ein Anhalt für Abweichungen in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der einzelnen Chargen aufgedeckt und andererseits ein Einblick in die Reproduzierbarkeit der Messwerte gewonnen werden. Dabei zeigte es sich, dass die vergleichbaren Kurven mit Abweichungen von durchschnittlich $2 - 4$ Skalenteilen - in vereinzelt Ausnahmefällen bis zu 10 Skalenteilen - reproduziert wurden. Diese Unterschiede traten lediglich bei einzelnen Absorptionsban-

den auf, während die Nulllinie beispielsweise stets gleiche Werte zeigte. Als Verdünnungs- und Bezugslösung diente der bei der jeweils zugehörigen Elektrophorese benutzte, auf 1/12 verdünnte Natrium - Phosphat - Zitrat - Puffer. Es wurde streng darauf geachtet, dass vor jeder Messung der Küvettenfehler, der, wie aus der Betriebsanleitung der Firma Beckman hervorgeht, bis zu 3% betragen kann, ausgeschlossen wurde. In vorangegangenen Messreihen war ein gut zusammenpassendes Küvettenpaar ermittelt worden, das dann für sämtliche Messungen benutzt wurde. Vor Beginn wurde stets eine 0- und 100-Prozentlinie aufgezeichnet, indem Puffer gegen Puffer bei offenem und geschlossenem Strahlengang registriert wurde. Hierbei ergaben sich Schwierigkeiten, die darauf zurückgeführt werden mussten, dass die Bezugslösung selbst eine hohe Eigenabsorption im untersuchten Spektralbereich zeigte. Darauf soll weiter unten noch ausführlich eingegangen werden. Nach jeder Messung wurden die Küvetten mehrmals mit Aqua dest. gründlich gereinigt und anschliessend mit absolutem, unvergälltem Alkohol durchgespült. Gelegentlich war auch eine zusätzliche Reinigung mit Salzsäure-Alkohol erforderlich. Der Säuberung wurde stets eine mehrtägige Wässerung der Küvetten angeschlossen, nachdem sich gezeigt hatte, dass sonst nicht alle Verunreinigungen hinreichend sicher entfernt waren.

Es wurden sämtliche Fraktionsröhrchen in einem Wellenlängenbereich von 220 - 340 μ gemessen, das Ultrakonzentrat und darüber hinaus einzelne Röhrchen eines jedem untersuchten Stammes noch zwischen 340 - 900 μ , nachdem sich gezeigt hatte, dass eine routinemässige Messung sämtlicher Fraktionsröhrchen im langwelligen Bereich keinen weiteren Aufschluss mehr erbrachte. Als Küvetten benutzten wir Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Wichtig war ferner, dass die spektrophotometrische Messung der elektrophoretischen Auftrennung möglichst unmittelbar angeschlossen wurde, da sich sowohl die Vergleichslösung als auch der Inhalt der Fraktionsröhrchen trotz Aufbewahrung im Kühlschrank bei +4 Grad C in ihrem Absorptionsverhalten

änderten (vergl. SANDRITTER (50)).

Allgemeine und spezielle Probleme bei der spektrophotometrischen Untersuchung

Als optimale Vorbedingung für spektrophotometrische Messungen gilt das Vorliegen einer Reinsubstanz in einem Lösungsmittel, das in dem in Frage kommenden spektralen Untersuchungsbereich keine Absorptionsbande hat.

Diese beiden Bedingungen wurden bei der vorliegenden Untersuchung nicht erfüllt: Bei den elektrophoretisch isolierten Einzelfractionen aus der Tuberkulinmuttersubstanz handelt es sich in der Regel um komplexe Substanzen. Das benutzte Lösungsmittel, nämlich der Elektrophoresepuffer, zeigt in dem zur Anwendung gekommenen Spektralbereich von 220 - 340 μ eine starke Eigenabsorptionsbande bei 265 - 285 μ und unter 230 μ , wie aus der Abbildung 1 hervorgeht. Die Fraktionsspektren sind somit Differenzspektren. Darunter versteht man eine Absorptionsmessung, bei der sowohl die zu untersuchende Substanz als auch ihr Lösungsmittel eine Absorption im gleichen Bereich zeigen. Die Domäne dieser Untersuchungsart ist die Aufdeckung geringer spektraler Unterschiede bei Vergleichsuntersuchungen verschiedener Lösungen. Insofern war die Anwendung dieser differenzanalytischen Methode für die vorliegende Fragestellung durchaus wertvoll. Andererseits erwuchsen aus der hohen Eigenabsorption des Lösungsmittels besondere Schwierigkeiten, die umfangreiche Voruntersuchungen notwendig machten mit dem Ziel, den Messbereich des Spektrophotometers den gegebenen Umständen optimal anzupassen. Ihr Ergebnis ist weiter vorn bereits mitgeteilt. Die Schwierigkeit lag in der Tatsache, dass bei einer mittleren Empfindlichkeitseinstellung und einer mittleren Zeitkonstanten (Dämpfung) die Energie des Geräts trotz 20facher Sekundärelektronenvervielfachung nicht ausreicht für die Messung von Puffer gegen Puffer. Das führte dazu, dass in den Wellenbereichen mit maximaler Absorption des Puffers die 100-Prozentlinie trotz grösster Spaltbrei-

te von der Geraden abwich. Dieser Fehler konnte durch die gleichzeitige Anwendung einer hohen Empfindlichkeit mit einer kleinen Zeitkonstanten ausgeschaltet werden bis auf den Bereich zwischen 220 und 225 μ . Dort konnte auch bei dieser Einstellung zufolge der hohen Eigenabsorption des Puffers die für eine genaue Messung notwendige Mindestenergie nicht erreicht werden. Dabei musste gleichzeitig ein stärkeres " Rauschen " des Systems in Kauf genommen werden.

Chemische Untersuchung des elektrophoretisch zerlegten Ultrakonzertrats

Der spektrophotometrischen Untersuchung der Elektrophoresefraktionen wurde die chemische Untersuchung angeschlossen. Sie erstreckte sich auf die qualitative Analyse der 32 Elektrophoreseröhrchen auf Eiweiss, Kohlehydrat, Eisen, Katalase und Esterase. Ausserdem wurden auf dem Trennungsbogen noch durch Färbungsmethoden Nukleinsäuren, Lipide und ninhydrin-positive Substanzen bestimmt. Diese Untersuchungen wurden nach den Angaben von MICKE (34) durchgeführt.

III. E r g e b n i s s e

A. Spektrophotometrisches Verhalten der Hauptfraktionen

Mit den ersten Abbildungen (1 - 4) soll an Hand einfacher, bekannter Substanzen eine gewisse Grundlage für eine spätere Deutung der bei TMS-Fraktionen erzielten Befunde gelegt werden. Wie oben schon erwähnt, hat der Elektrophoresepuffer, dem aus Sterilitätsgründen geringe Mengen Phenol zugesetzt waren, bereits eine erhebliche Eigenabsorption. Abbildung 1 veranschaulicht diese Verhältnisse und lässt erkennen, dass der Puffer in der zur Elektrophorese benutzten Konzentration (Kurve 2) alle in späteren Messungen auftauchenden Absorptionsmaxima von 220 - 310 μ überlagert. Für die Herstellung der Aminosäurelösungen und Fraktionsverdünnungen (siehe Abbildungen 2 - 12) wurde - soweit nicht anders angegeben - phenolhaltiger oder phenolfreier, mit Aqua dest. 1:12 verdünnter Natrium - Phosphat - Zitrat - Puffer benutzt. Neben den Absorptionsspektren der Ultrakonzentrate der verschiedenen untersuchten Stämme im ultravioletten und sichtbaren Bereich werden anschliessend (Abbildungen 4 - 12) Spektren von den Elektrophoreseröhrchen wiedergegeben, bei denen die Charakteristika der aufgetrennten TMS - Bestandteile besonders deutlich hervortreten. Auf die Wiedergabe sämtlicher 32 Kurven, die aus einem Elektrophoreseversuch gewonnen wurden, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Für die Abbildungen 4 - 12 wurde stets die Verdünnung gewählt, bei der die Kurve optimal im Messbereich des Gerätes lag.

Abbildung 1

In der nebenstehenden Abbildung wird die Lage der Maxima des Natrium-Phosphat-Citratpuffers mit und ohne Phenolzusatz dargestellt.

Kurve 1: Ungebrauchter Natrium-Phosphat-Citratpuffer ohne Phenol. Verdünnung 1:12 mit Aqua bidest.

Kurve 2: Ungebrauchter Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer mit 2% Phenol. Verdünnung 1:12 mit Aqua bidest. = 1/6% (0,1666%) Phenolendkonzentration.

Es wurde absichtlich eine zur Kurve 1 vergleichbare Konzentration gewählt. Eine Registrierung dieser Kurve war jedoch nur teilweise möglich, da die Absorption schon bei 310 m μ so anstieg, dass bei 295 m μ der Messbereich bereits überschritten wurde.

Kurve 3: Ungebrauchter Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer mit 2% Phenol. Verdünnung 1:600 mit Aqua bidest.

Man findet ein Maximum bei 269 m μ mit 2 Schultern bei 264 m μ und 275 m μ . Selbst bei diesem extrem verdünnten Puffer überschreitet die Extinktion der Lösung unterhalb 230 m μ den Messbereich, wobei sich der Spalt maximal öffnet.

UV-Spektren von Natrium-Phosphat-Citratpuffer im Vergleich zu Aqua dest.

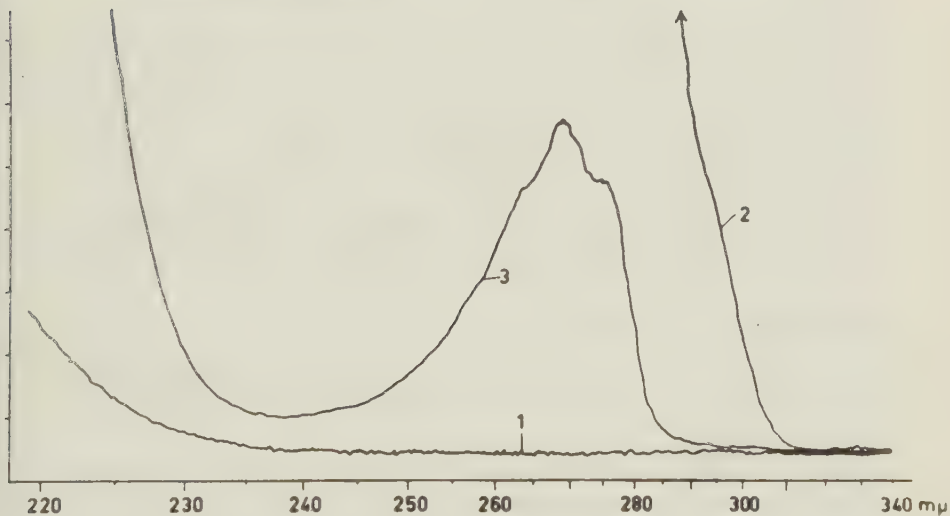


Abbildung 2

Um zu prüfen, wie sich typische, niedermolekulare Bestandteile der Proteine (Aminosäuren) unter unseren Versuchsbedingungen in ihrer Lichtabsorption verhalten, wurde zunächst Tyrosin in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Zur Verdünnung wurde phenolhaltiger Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer benutzt.

Abbildung 2 a (oben) :

Kurve 1: 10 mg%ige Lösung von Tyrosin

Kurve 2: 5 mg%ige Lösung von Tyrosin

Kurve 3: 2,5 mg%ige Lösung von Tyrosin

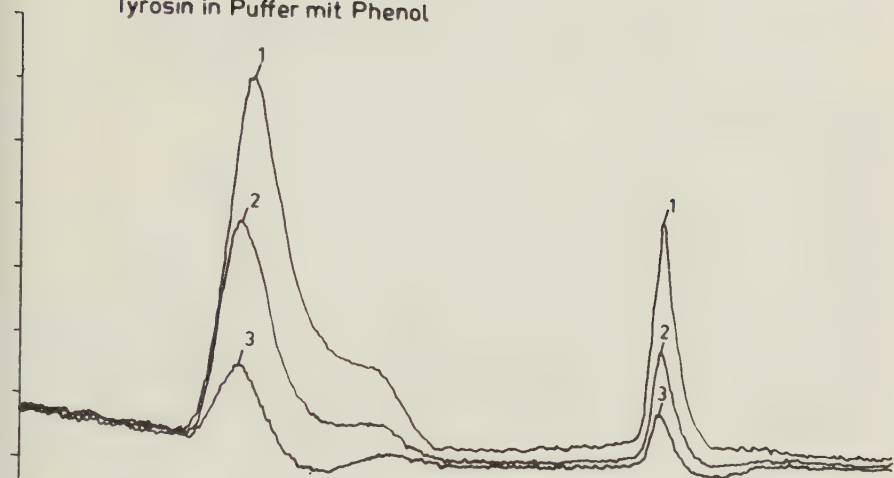
Das Tyrosin zeigt ein Maximum bei 234 μ , sowie ein Maximum bei 283 μ mit einer Schulter bei 245 μ . Die Nulllinie steigt unterhalb von 230 μ an. Es ist eine deutliche Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration erkennbar und somit in etwa die Forderung des Lambert-Beer'schen Gesetzes erfüllt. Bereits hier sei darauf aufmerksam gemacht, dass im Bereich von 240 μ die Extinktion bei niedrigeren Konzentrationen die Nulllinie unterschreitet.

Abbildung 2 b (unten) :

Es handelt sich um die Absorptionskurve einer 1mg%igen Lösung von Tyrosin in Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer ohne Phenol.

Es fällt das völlig andere Absorptionsverhalten der Lösung ohne Phenolzusatz ins Auge. Die Maxima zeigen eine seitliche und quantitative Abweichung. So liegt ein breites Maximum bei 223 μ und ein anderes bei 275 μ . Obwohl die Konzentration von 1 mg% nur 1/10 von der in Abb. 2a (Kurve 1) wiedergegebenen ist, ist die Extinktion der beiden Lösungen im kurzwelligen Maximum etwa gleich gross. Zur Abb. 2a vergleichbare Konzentrationen waren nicht messbar, da ihre entsprechenden Extinktionen bereits oberhalb 300 μ aus dem Messbereich fielen.

Tyrosin in Puffer mit Phenol



Tyrosin in Puffer ohne Phenol

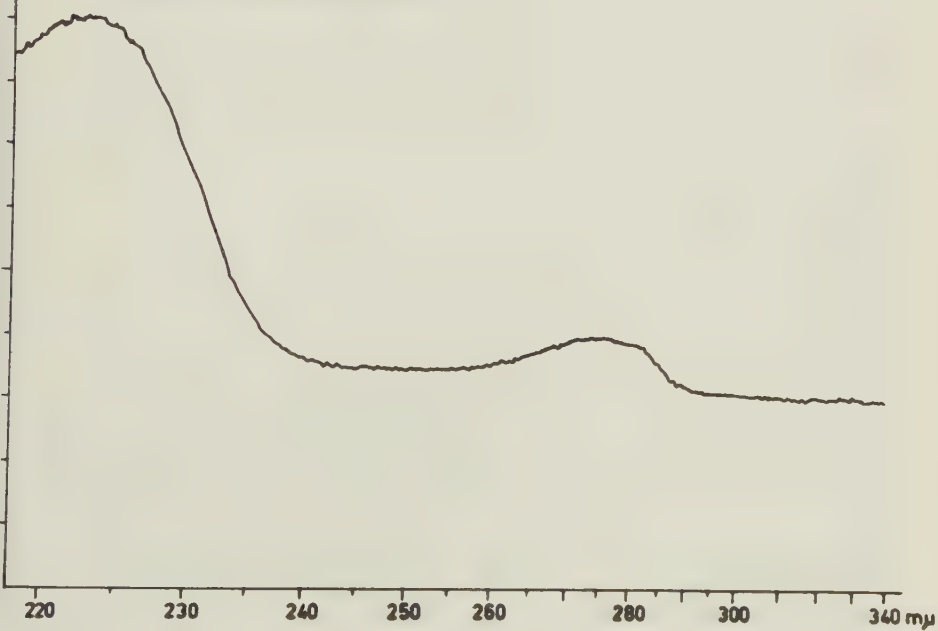


Abbildung 3

Als weitere Aminosäure wurde T r y p t o p h a n in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Zur Verdünnung wurde phenolhaltiger Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer benutzt.

Abbildung 3 a (oben):

Kurve 1: 10 mg%ige Lösung von T r y p t o p h a n

Kurve 2: 3,3mg%ige Lösung von T r y p t o p h a n

Kurve 3: 1 mg%ige Lösung von T r y p t o p h a n

Kurve 4: 0,5mg%ige Lösung von T r y p t o p h a n

In einer Lösung von T r y p t o p h a n in phenolhaltigem Puffer fällt ein zweigipfliges Maximum bei 234-235 μ und 245-247 μ auf. Ein drittes Maximum mit einer gegenüber Tyrosin breiten Spitze liegt bei 283-288 μ . Auch hier ist die Extinktion von der Konzentration abhängig. Ausser durch die etwa gleichstarken zweigipfligen Maxima unterscheidet sich das Tryptophanspektrum vom Tyrosinspektrum durch wesentlich höhere Extinktionen bei 283 μ im Vergleich zu den Maxima bei 234-247 μ . Das Ansteigen der Kurve unterhalb von 230 μ entspricht dem Anstieg der zugehörigen Nulllinie. Bei niedrigen Substanzkonzentrationen liess sich diese Beobachtung wiederholt in noch stärkerer Masse machen. Bei weiteren Verdünnungsstufen gleicht sich die Kurve von unten her der Nulllinie wieder an.

Abbildung 3 b (unten):

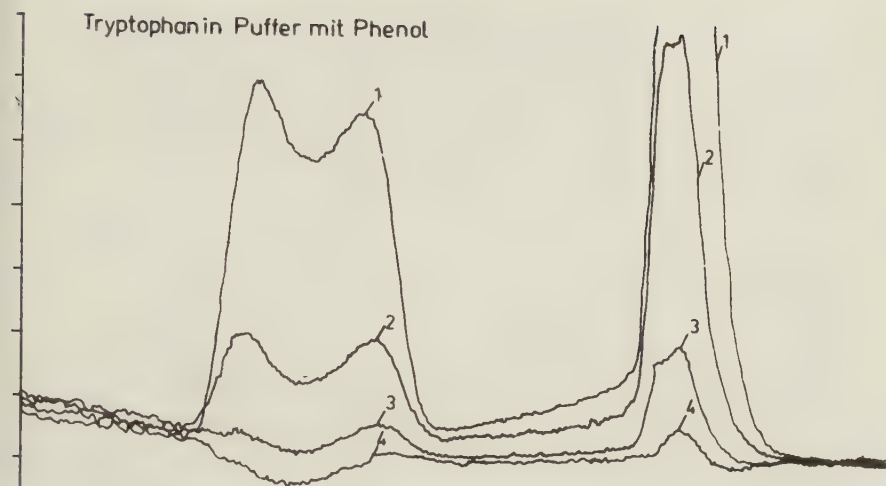
T r y p t o p h a n in Puffer o h n e Phenol.

Kurve 1: 0,5 mg%ige Lösung von T r y p t o p h a n

Kurve 2: 0,166 mg%ige Lösung von T r y p t o p h a n

Die in Kurve 1 gemessene Konzentration entspricht der von Kurve 4 in Abb. 3a. Während in Puffer mit Phenol im kurzwelligen Bereich keine Absorption und bei 283 μ nur eine geringe Absorption zu finden ist, steigt die Absorption in Puffer ohne Phenol über den Messbereich hinaus an. Das zweite Maximum im Bereich von 270-290 μ ist so breit, dass keine genaue Lage angegeben werden kann. In Kurve 2 bei der die wiedergegebene Konzentration um $\frac{1}{3}$ niedriger ist, liegt das kurzwellige Maximum etwa bei 220 μ .

Tryptophan in Puffer mit Phenol



Tryptophan in Puffer ohne Phenol

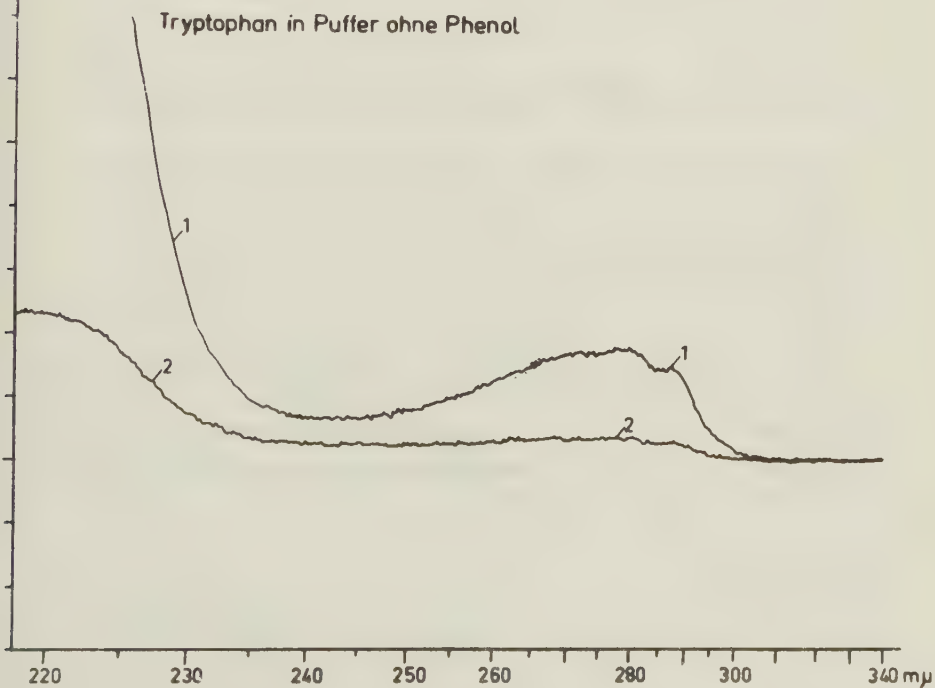


Abbildung 4

Es werden die Absorptionsspektren von Ribonukleinsäure und bovinem Serumalbumin in verschiedenen Lösungsmitteln wiedergegeben.

Abbildung 4 a (oben):

Lösung von Ribonukleinsäure und bovinem Serumalbumin (0,02 mg%) in phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Ausgangslösung war 20%iges Serumalbumin, das mit Natriumacid (1:1000) und Äthylendiamintetraacetat (0,5%) konserviert war.

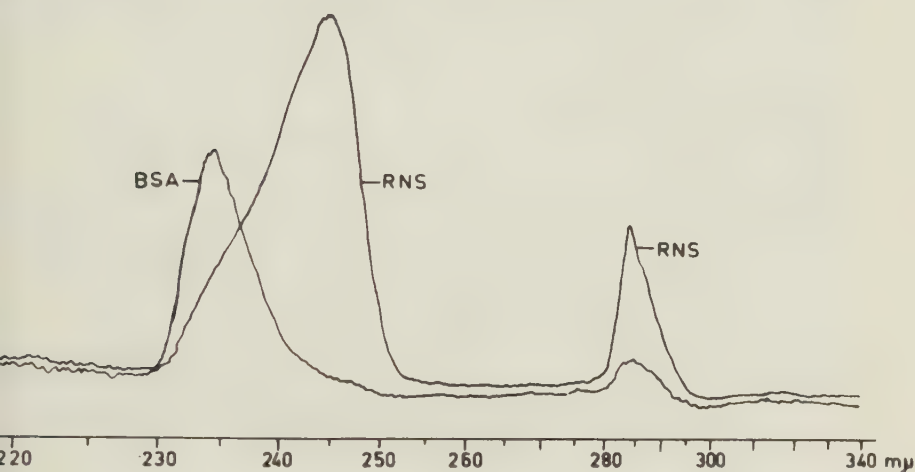
Bei dem Ribonukleinsäurespektrum erscheinen in Anwesenheit von Phenol zwei Maxima, und zwar bei 245 μ und 283 μ . Beim bovinen Serumalbumin liegt das langwellige Maximum ebenfalls bei 283 μ , das kurzwellige jedoch bei 234 μ .

Abbildung 4 b (unten):

Lösung von Ribonukleinsäure und von bovinem Serumalbumin (0,02 mg%) in Aqua dest. Ausgangslösung war wiederum 20%iges Serumalbumin, das mit Natriumacid (1:1000) und Äthylendiamintetraacetat (0,5%) konserviert war.

In Aqua dest. ist das Maximum des bovinen Serumalbumins gegenüber der Ribonukleinsäure nach rechts verschoben und liegt bei 278 μ , während das der Ribonukleinsäure bei 260 μ aufgezeichnet wird. Im Bereich von 270-280 μ ist die Absorption fast gleich, während im kurzwelligeren Bereich die Absorption des bovinen Serumalbumins die der Ribonukleinsäure erheblich übersteigt.

Kontinuierliche UV-Spektren von Ribonukleinsäure
und bovinem Serumalbumin in Puffer mit Phenol



Kontinuierliche UV-Spektren von Ribonukleinsäure
und bovinem Serumalbumin in Aqua dest.

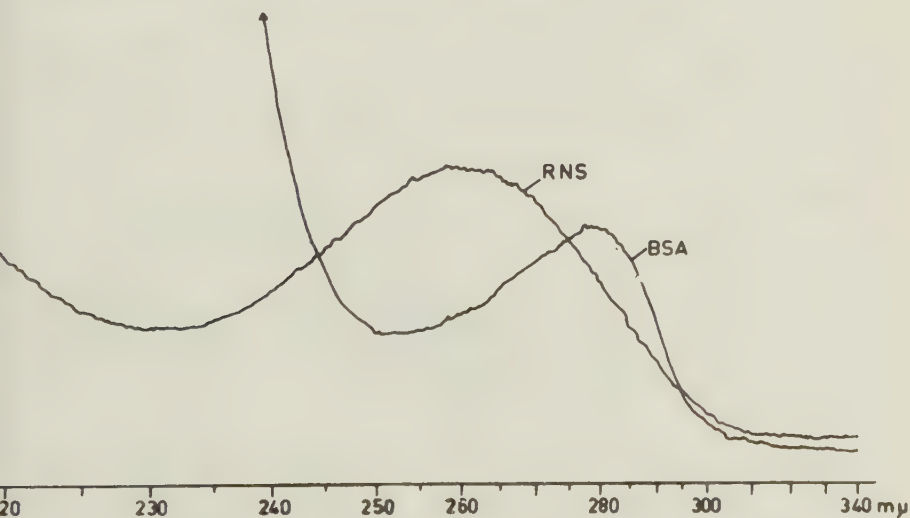


Abbildung 5

Darstellung der kontinuierlich aufgezeichneten UV-Absorptionsspektren von unzerlegten Ultrakonzentraten virulenter Stämme vom Typus humanus.

Abbildung 5 a (oben):

Kontinuierliches UV-Spektrum von TMS-B 207-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 1⁺:

Kurve 1: Verdünnung 1:50 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Das Maximum liegt bei 235 μ mit einer Schulter bei 245 μ , ein weiteres Maximum kommt bei 283 μ zur Aufzeichnung.

Kurve 2: In Aqua dest. bei der Ultrafiltration aufgenommen. Hier liegt das Maximum bei 270 μ mit einer Schulter bei 275 μ . Unterhalb von 230 μ steigt die Absorption über den Messbereich hinaus an.

Abbildung 5 b (Mitte und unten):

Kontinuierliches Absorptionsspektrum von unzerlegtem Ultrakonzentrat aus TMS-B 251 im ultravioletten und sichtbaren Bereich, gewonnen aus dem Stamm Tb 29:

Kurve 1: Spektrum des UV-Bereichs. Verdünnung 1:200 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Das Maximum bei 245 μ ist bei dem Stamm Tb 29 relativ niedriger als bei dem Stamm Tb 1⁺. Gleiches gilt für das Maximum bei 283 μ . Ansonsten zeigen die beiden Abbildungen gleichartigen Verlauf.

Kurve 2: Spektrum des sichtbaren Bereichs. Verdünnung 1:4 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Hier liegt das Maximum zwischen 390 und 410 μ . Auf die Wiedergabe der entsprechenden Kurve des Stammes Tb 1⁺ wurde verzichtet, da sie keine neuen Aufschlüsse erbringt. Sie wurde ausserdem bereits von MICKE (34) veröffentlicht.

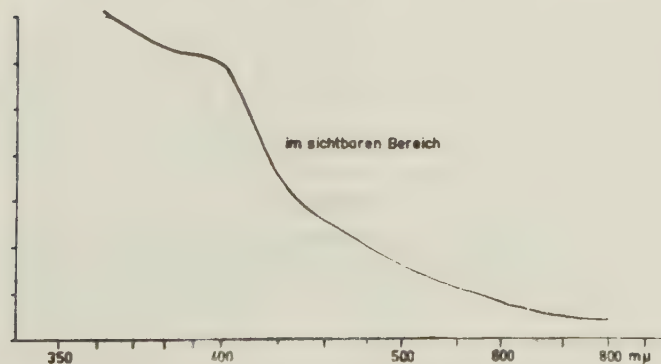
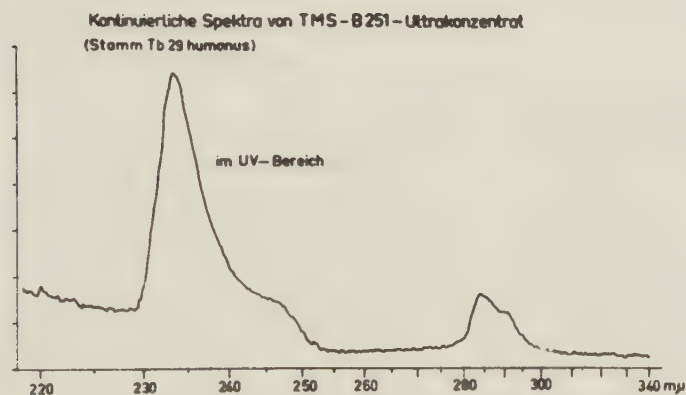
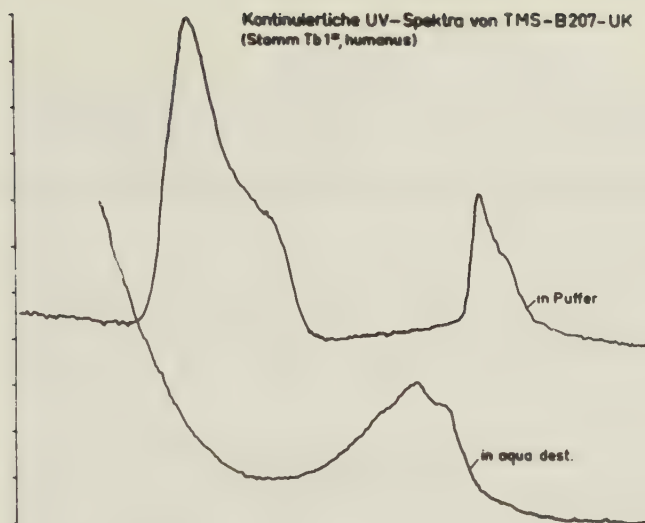


Abbildung 6

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS -P 251-UK-Fractionen nach elektrophoretischer Zerlegung, gewonnen aus dem Stamm Tb 29.

E 85-KH: Absorptionsspektrum der Kohlehydratfraktion

(vergl. dazu auch Abb. 13, Röhrchen 9 und 10)

Auffallend sind die niedrigen Extinktionswerte und das Unterschreiten der Nulllinie im Bereich von 233 bis 247 μ . Es sind nur wenig absorbierende Kohlehydrate vorhanden. Ein kleines Maximum liegt bei 283 μ . Es handelt sich um die Absorptionskurve der unverdünnten Lösung.

E 85-A : Absorptionsspektrum der Protein-A-Fraktion

(vergl. dazu auch Abb. 13, Röhrchen 12 bis 16)

Verdünnung 1:3 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Das Maximum liegt bei 233 μ mit einer Schulter bei 245 μ . Ein weiteres, breiteres und niedrigeres Maximum findet sich bei 283 μ mit einer Schulter bei 287 μ .

E 85-B : Absorptionsspektrum der Protein-B-Fraktion

(vergl. dazu auch Abb. 13, Röhrchen 16 bis 24)

Verdünnung 1:10 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Auch hier liegt das Maximum bei 233 μ mit einer Schulter bei 245 μ . Die Extinktion ist allerdings gegenüber der Protein-A-Fraktion deutlich grösser, während das Maximum bei 283 μ in seiner Form und Höhe etwa gleich ist.

E 85-C : Absorptionsspektrum der Protein-C-Fraktion

(vergl. dazu auch Abb. 13, Röhrchen 23 bis 25)

Verdünnung 1:4 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Die Kurve erscheint insgesamt flacher. Neben einem etwas breiteren Maximum bei 233 μ fällt auf, dass die auf den anderen Kurven zur Darstellung gekommene Schulter jetzt deutlich abgesetzt ist und einem zweiten Gipfel bei 246-249 μ entspricht. Das Maximum bei 283 μ zeigt gegenüber den anderen Kurven keine Besonderheiten. Das Ansteigen der Kurve unterhalb von 230 μ entspricht dem Anstieg der zugehörigen Nulllinie.

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-B 251-UK-Fractionen (humanus)

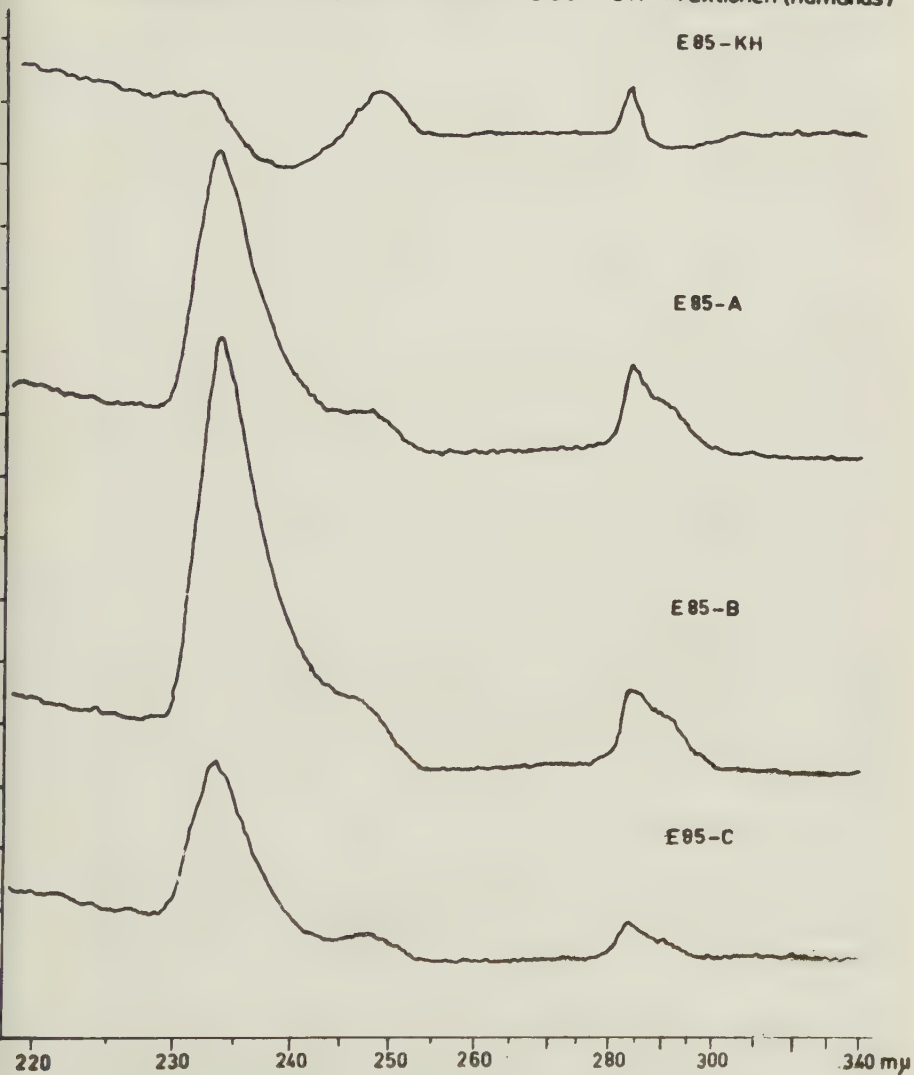


Abbildung 7

Kontinuierliche Spektren von unzerlegten bovinen TMS-Ultrakonzentraten im ultravioletten und sichtbaren Bereich, gewonnen aus den Stämmen Tb 39 (Vallée) und Tb 40 (Ravenel).

Abbildung 7 a (oben):

Kontinuierliches UV-Spektrum von TMS-F 245-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 39.

Verdünnung 1:25 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer.

Ein Maximum liegt bei 234 μ mit einer Schulter bei 245 μ , ein weiteres bei 283 μ .

Abbildung 7 b (Mitte):

Kontinuierliches UV-Spektrum von TMS-F 249-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 40.

Verdünnung 1:180 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer.

Das Maximum liegt bei 234 μ mit einer Schulter bei 245 μ , ein weiteres liegt bei 283 μ mit einer deutlichen Schulter bei 290 μ .

Abbildung 7 c (unten):

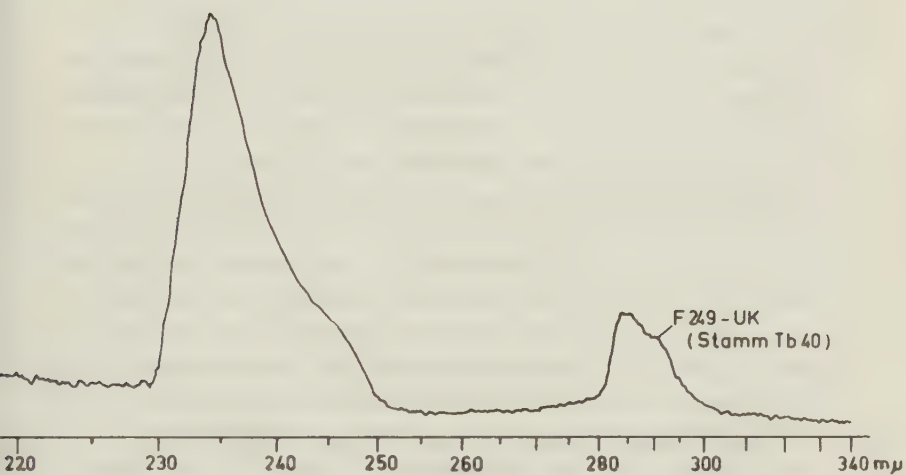
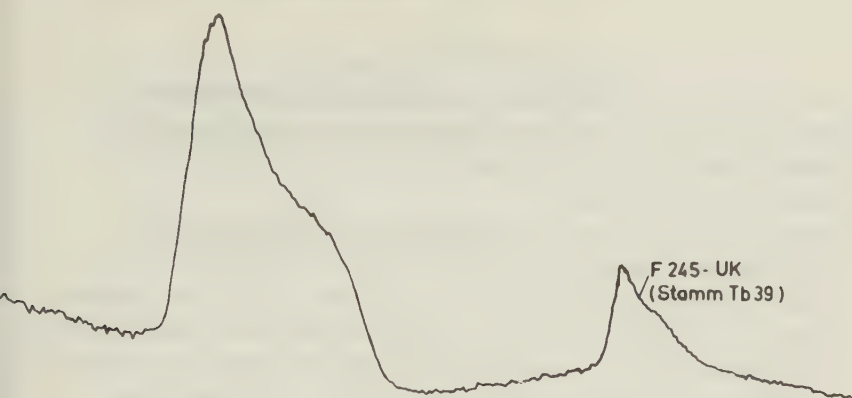
Kontinuierliches Spektrum im sichtbaren Bereich von bovinem TMS-Ultrakonzentrat, gewonnen aus dem Stamm Tb 40.

Verdünnung 1:10 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer.

Das Maximum liegt zwischen 390 und 410 μ .

Auf die Wiedergabe des Spektrums des Stammes Tb 39 im sichtbaren Bereich wurde verzichtet, da die beiden Kurven übereinstimmen.

Kontinuierliche - UV - Spektren von unzerlegten
bovinen TMS - Ultrakonzentraten



Kontinuierliches Spektrum von bovinem TMS - Ultrakonzentrat
im sichtbaren Bereich

Abbildung 8

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-F 245-UK-Fractionen nach elektrophoretischer Zerlegung, gewonnen aus dem Stamm Tb 39

Es handelt sich hier bei allen vier Kurven um die Spektren der unverdünnten Lösungen.

E 79-KH:UV-Absorptionsspektrum der Kohlehydratfraktion

(vergl.dazu auch Abb.14,Röhrchen 12 und 13).Ein Maximum liegt bei 234 μ und setzt sich fort in ein nur unwesentlich niedrigeres bei 245 μ .Ein drittes,auffallend schlankes Maximum kommt bei 283 μ zur Darstellung.Die Extinktionen der Maxima bei 234 und 283 μ sind annähernd gleich gross.

E 79-A :UV-Absorptionsspektrum der Protein-A-Fraktion

(vergl.dazu auch Abb.14,Röhrchen 15 bis 19).Es kommt ein Maximum bei 234 μ zur Darstellung mit einer deutlichen Schulter bei 245 μ .Das Maximum bei 283 μ zeigt ebenfalls eine angedeutete Schulter bei 290 μ .

E 79-B :UV-Absorptionsspektrum der Protein-B-Fraktion

(vergl.dazu auch Abb.14,Röhrchen 19 bis 24).Das Maximum bei 234 μ zeigt im Vergleich zu den anderen Kurven die grösste Extinktion und ist sehr schlank.Eine verhältnismässig kleine Schulter setzt sich bei 245 μ ab.Bei 283 μ kommt ein weiteres Maximum mit einem angedeutetem Knie zur Aufzeichnung,welches wiederum bei 290 μ liegt.

E 79-C :UV-Absorptionsspektrum der Protein-C-Fraktion

(vergl.dazu auch Abb.14,Röhrchen 24 bis 26).Die Kurve zeigt im Vergleich zu den übrigen Proteinfractionen die niedrigsten Ausschläge.Die Maxima liegen auch hier bei 283 μ und bei 234 μ mit einer Schulter bei 245 μ .

Beachtenswert ist,dass sich die Schulter bei 245 μ bei dem bovinen Stamm viel deutlicher absetzt als bei den analogen Kurven,die aus den Stämmen vom Typus humanus gewonnen wurden. Das Ansteigen der Kurve unterhalb von 230 μ entspricht dem Anstieg der zugehörigen Nulllinie.

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-F245 -
UK-Fraktionen (bovinus)

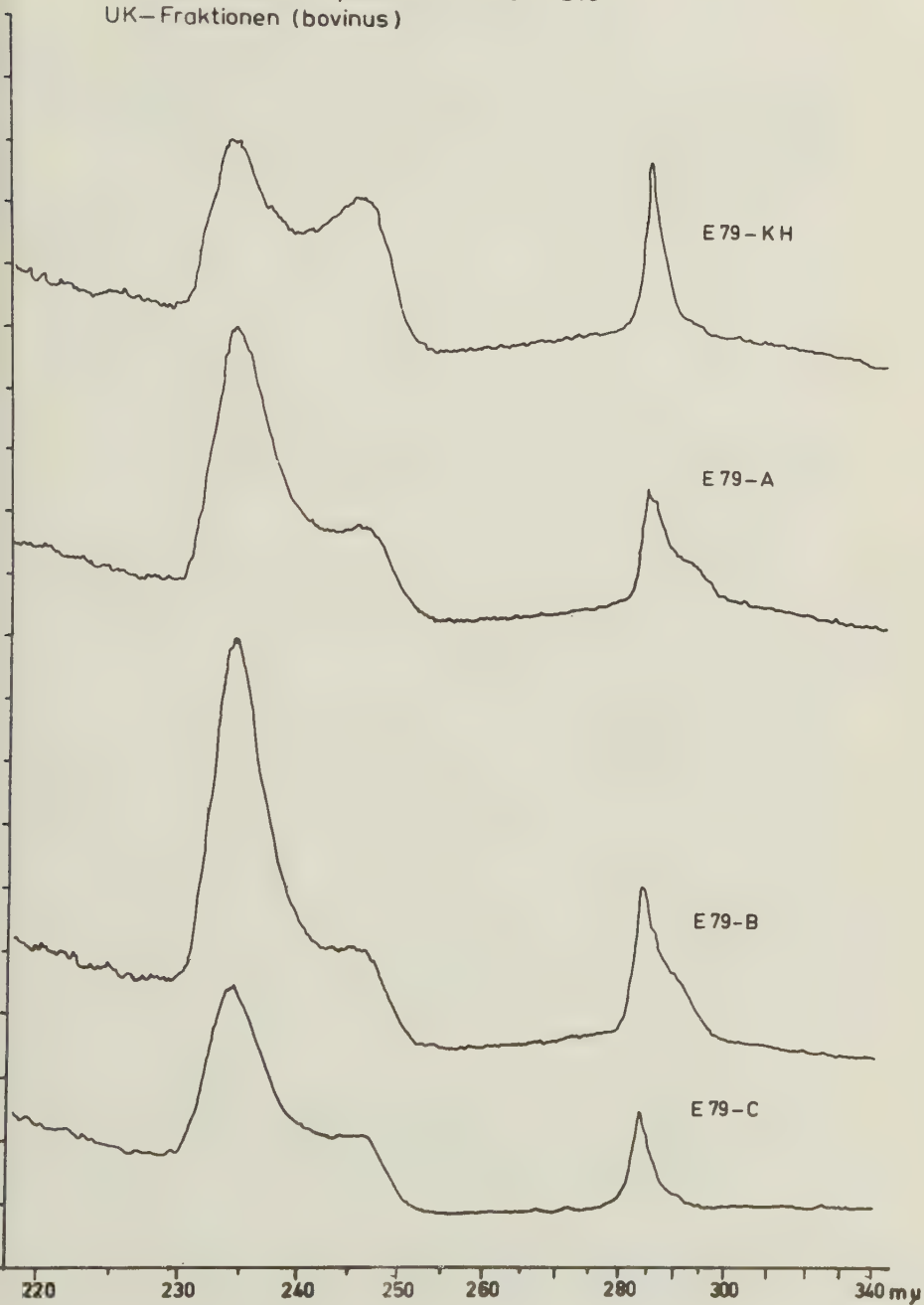


Abbildung 9

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-F 249-UK-Fractionen nach elektrophoretischer Zerlegung, gewonnen aus dem Stamm Tb 40

E 84-KH: UV-Absorptionsspektrum der Kohlehydratfraktion

(vergl. dazu auch Abb. 15, Röhrchen 10-13)

Es handelt sich um das Spektrum der unverdünnten Lösung. Auffallend sind die insgesamt niedrigen Extinktionswerte und das Unterschreiten der Nulllinie zwischen 234 und 246 μ . Diese Kohlehydratfraktion enthält offensichtlich nur sehr geringe Mengen absorbierender Kohlehydrate. Bei 283 μ ein angedeutetes Maximum, das nach rechts muldenförmig ausläuft.

E 84-A : UV-Absorptionsspektren der Protein-A-Fraktion

(vergl. dazu auch Abb. 15, Röhrchen 14-18)

Es handelt sich um das Spektrum der unverdünnten Lösung. Das Maximum liegt bei 233 μ mit einer deutlich abgesetzten Schulter bei 247 μ . Ein kleineres Maximum kommt bei 283 μ mit einer kleinen Schulter bei 290 μ zur Aufzeichnung.

E 84-B : UV-Absorptionsspektrum der Protein-B-Fraktion

(vergl. dazu auch Abb. 15, Röhrchen 19-24)

Verdünnung 1:3 mit phenolhaltigem Puffer. Es handelt sich bei Berücksichtigung der Verdünnung um die Fraktion mit den höchsten Extinktionswerten. Die Lage und Form der Maxima entspricht dem Absorptionsspektrum von Protein A.

E 84-C : UV-Absorptionsspektrum der Protein-C-Fraktion

(vergl. dazu auch Abb. 15, Röhrchen 26 und 27)

Es handelt sich um das Spektrum der unverdünnten Lösung. Ein Maximum liegt bei 233 μ mit deutlich abgesetzter Schulter bei 248 μ , und ein schlankes Maximum, das nach dem Langwelligen muldenförmig ausläuft, kommt bei 283 μ zur Aufzeichnung. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit dem Verlauf der entsprechenden Kurve des Stammes Tb 39.

Das Ansteigen der Kurve unterhalb von 230 μ entspricht dem Anstieg der zugehörigen Nulllinie.

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-F 249-
UK-Fraktionen (bovinus)

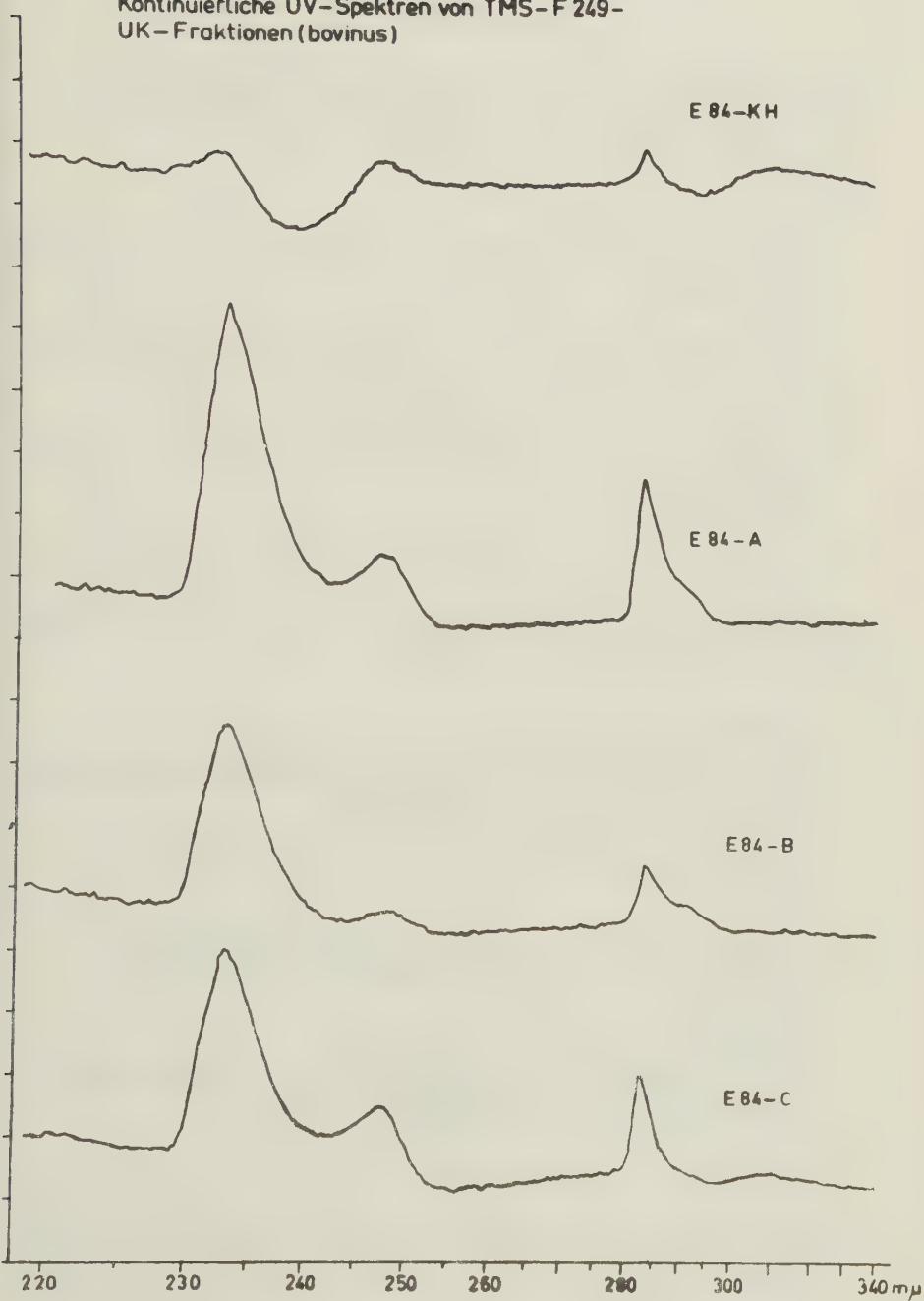


Abbildung 10

Kontinuierliche Spektren von unzerlegten, aviären TMS-Ultrakonzentraten im ultravioletten und sichtbaren Bereich, gewonnen aus den Stämmen Tb 9 und Tb 56

Abbildung 10 a (oben):

- 1) Kontinuierliches UV-Spektrum von TMS-H 247-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 9

Es handelt sich um das Spektrum der unverdünnten Lösung. Das Maximum liegt bei 234 μ und zeigt eine hohe Schulter bei 245 μ . Ein weiteres kleines, stumpfes Maximum kommt zwischen 280 und 300 μ zur Darstellung.

- 2) Kontinuierliches UV-Spektrum von TMS-H 243-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 56

Verdünnung 1:100 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Die Kurve zeigt ein schlankes Maximum bei 234 μ mit einer gut abgesetzten Schulter bei 245 μ . Ein zweites schlankes Maximum liegt bei 283 μ mit einer ange deuteten Schulter bei 290 μ .

Abbildung 10 b (unten):

- 1) Kontinuierliches Spektrum von TMS-H 243-UK im sichtbaren Bereich, gewonnen aus dem Stamm Tb 56

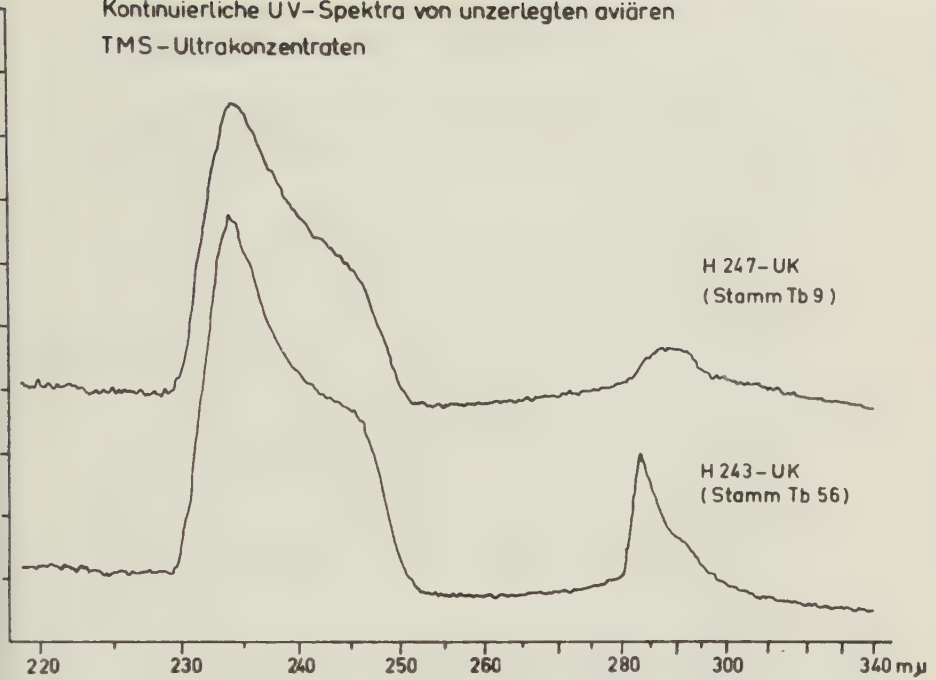
Es handelt sich um das Spektrum des unverdünnten TMS-Ultrakonzentrates. Das Maximum liegt zwischen 390 bis 410 μ .

- 2) Kontinuierliches Spektrum der Protein-C-Fraktion von TMS-H 243-UK im sichtbaren Bereich, gewonnen aus dem Stamm Tb 56

(vergl. dazu auch Abb. 16, Röhrchen 22)

Es handelt sich um das Spektrum der unverdünnten Lösung. Das Maximum liegt zwischen 390 und 410 μ .

Kontinuierliche UV-Spektren von unzerlegten aviären
TMS-Ultrakonzentraten



Kontinuierliche Spektren von aviärem TMS-Ultrakonzentrat
und aviärem Protein C im sichtbaren Bereich

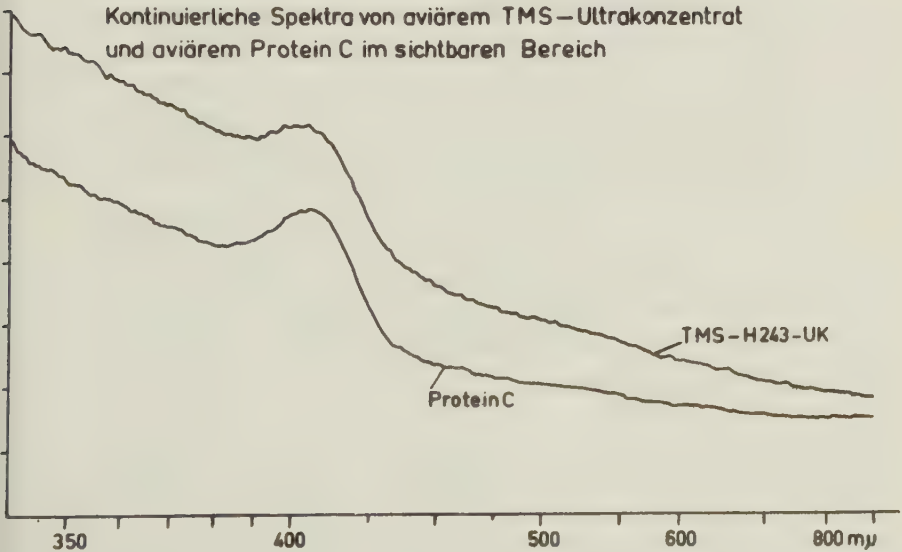


Abbildung 11

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-H 243-UK-Fractionen nach elektrophoretischer Zerlegung, gewonnen aus dem Stamm Tb 56

E 78-KH:UV-Absorptionsspektrum der Kohlehydratfraktion

(vergl.dazu auch Abb.16,Röhrchen 11 und 12)

Verdünnung 1:6 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Ein zweigipfliges Maximum liegt bei 233 m μ und 245 m μ . Ein weiteres schlankes Maximum kommt bei 283 m μ zur Aufzeichnung.

E 78-A :UV-Absorptionsspektren der Protein-A-Fraktion

(vergl.dazu auch Abb.16,Röhrchen 14-16)

Verdünnung 1:2 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Das Maximum liegt bei 234 m μ und zeigt eine angedeutete Schulter bei 247 m μ . Ein weiteres, breiteres Maximum liegt bei 283 m μ mit einer Schulter bei 290 m μ .

E 78-B :UV-Absorptionsspektrum der Protein-B-Fraktion

(vergl.dazu auch Abb.16,Röhrchen 19 und 20)

Verdünnung 1:2 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Das Maximum liegt wiederum bei 234 m μ , die Schulter 247 m μ setzt sich aber deutlicher ab als bei E 78-A. Bei 283 m μ wird ein zweites Maximum mit einer hohen und breiten Schulter bei 290 m μ sichtbar.

E 78-C :UV-Absorptionsspektrum der Protein-C-Fraktion

(vergl.dazu auch Abb.16,Röhrchen 22-24)

Verdünnung 1:4 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Die höchste Absorption liegt wiederum bei 234 m μ . Das Maximum zeigt im Vergleich zu den beiden anderen Proteinkurven eine höhere Schulter bei 247 m μ . Ein weiteres Maximum mit breiter Schulter liegt bei 283 m μ .

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-H243-UK-Fractionen (aviär)

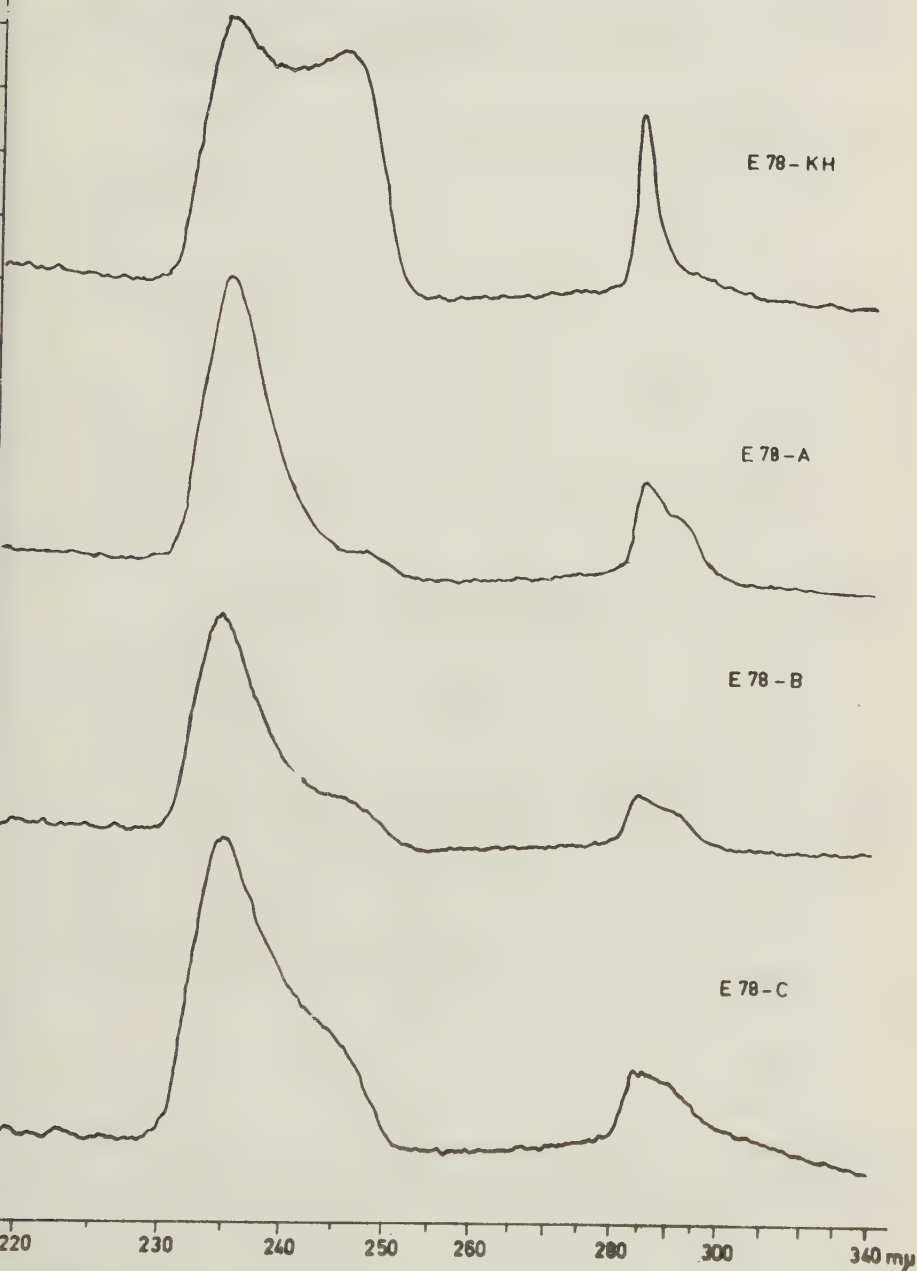


Abbildung 12

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-H 247-UK-Fractionen nach elektrophoretischer Zerlegung, gewonnen aus dem Stamm Tb 9

E 82-KH: UV-Absorptionsspektrum der Kohlehydratfraktion
(vergl.dazu auch Abb.17, Röhrrchen 11-13)

Verdünnung 1:4 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Ein zweigipfliges, nicht durch ein Minimum getrenntes Maximum liegt bei 234 μ und 247 μ . Ein angedeutetes breites Maximum kommt zwischen 283 und 300 μ zur Darstellung.

E 82-A : UV-Absorptionsspektrum der Protein-A-Fraktion
(vergl.dazu auch Abb.17, Röhrrchen 15)

Es handelt sich um das Spektrum der unverdünnten Lösung. Man sieht ein hohes und schlankes Maximum bei 234 μ mit einer kleinen Schulter bei 247 μ . Ein weiteres Maximum liegt bei 283 μ und hat eine Schulter bei 290 μ .

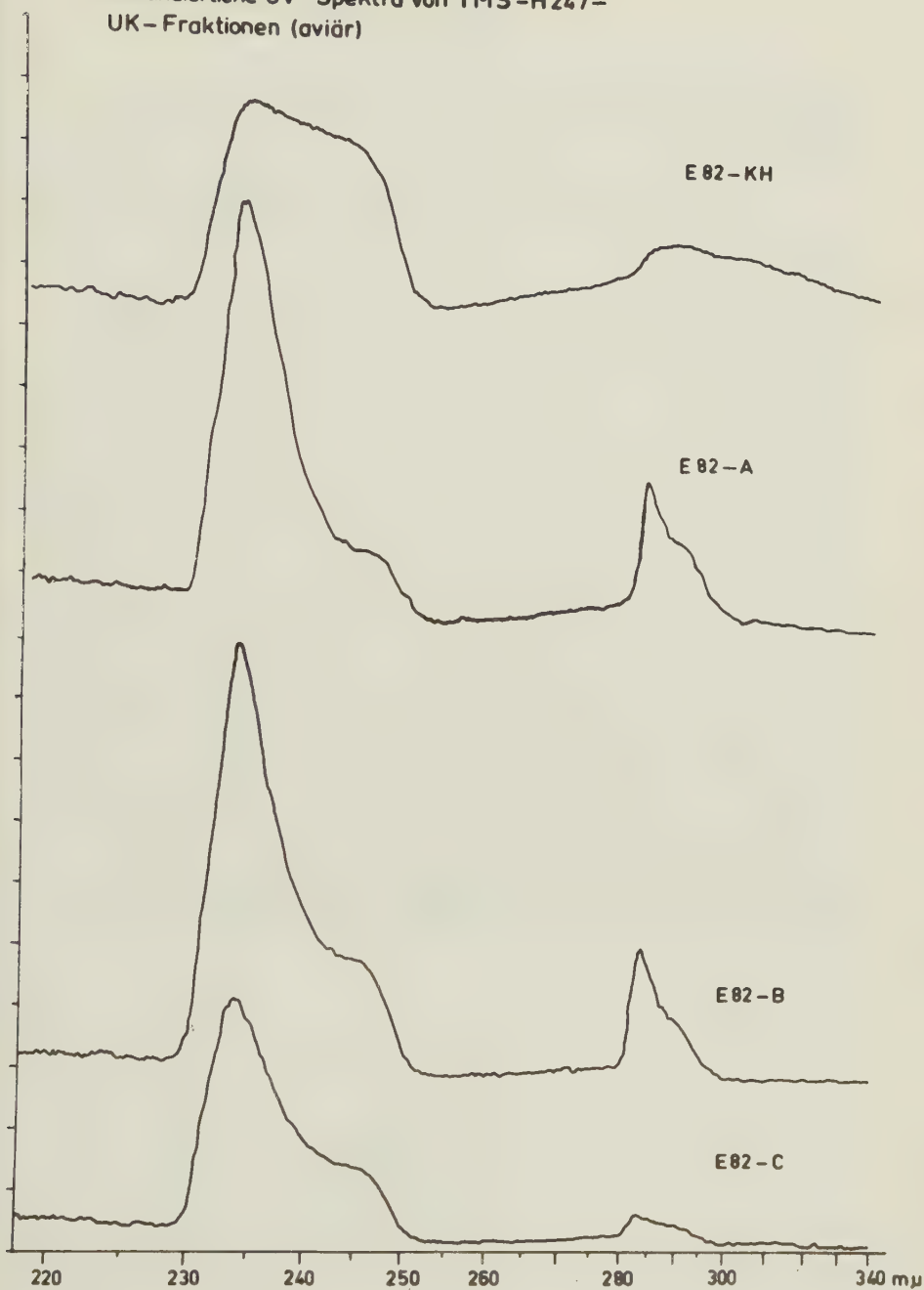
E 82-B : UV-Absorptionsspektrum der Protein-B-Fraktion
(vergl.dazu auch Abb.17, Röhrrchen 19-21)

Es handelt sich um das Spektrum der unverdünnten Lösung. Die Kurve zeigt praktisch den gleichen Verlauf wie die von Protein A. Lediglich die Schulter bei 247 μ zeigt eine etwas höhere Extinktion.

E 82-C : UV-Absorptionsspektrum der Protein-C-Fraktion
(vergl.dazu auch Abb.17, Röhrrchen 23 und 24)

Verdünnung 1:2 mit phenolhaltigem Natrium-Phosphat-Citrat-Puffer. Die Kurve zeigt ein Maximum bei 234 μ und eine im Vergleich hierzu relativ hohe Schulter bei 245 μ . Ein weiteres, nur angedeutetes Maximum liegt zwischen 283 und 300 μ .

Kontinuierliche UV-Spektren von TMS-H247-
UK-Fraktionen (aviär)



B. Vergleich aller Einzelfractionen bei konstanten Wellenlängen

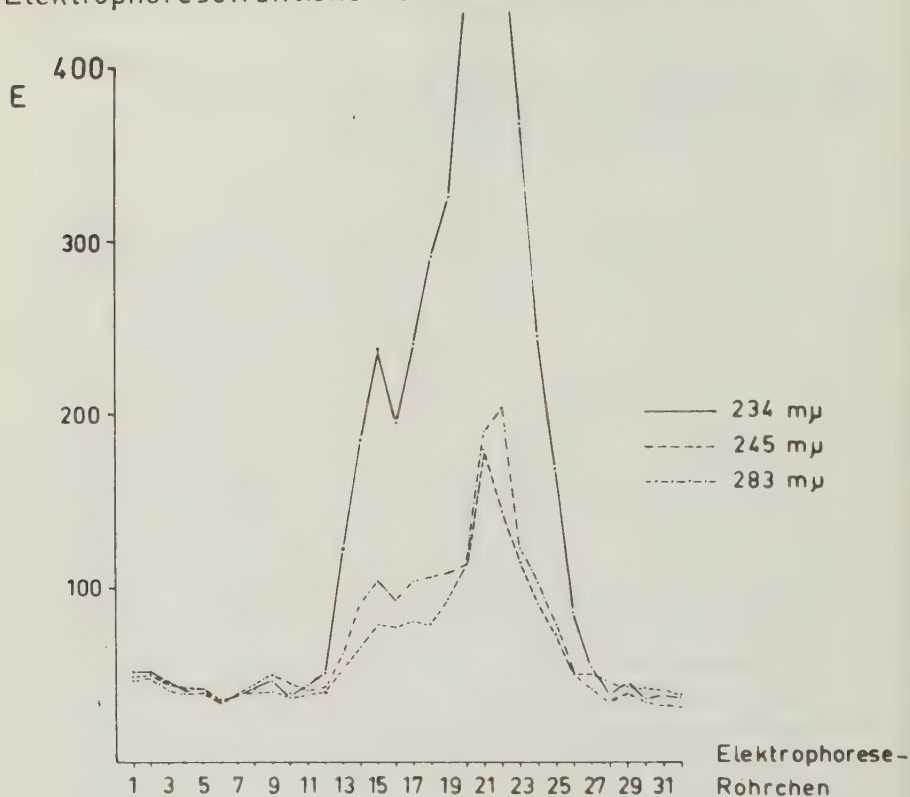
Die anschliessend zur Darstellung gebrachten Kurven und Schemata zeigen das Absorptionsverhalten sämtlicher 32 durch elektrophoretische Zerlegung gewonnenen Fraktionen aus TMS-Ultrakonzentraten bei bestimmten Wellenlängen parallel zu den chemischen Nachweisreaktionen. Die Kurven wurden so erzielt, dass den kontinuierlichen Spektren aller Fraktionen die Extinktionswerte der Maxima bei 234, 245, 283 μ entnommen wurden. Auf der Abszisse sind die Elektrophoreseröhrchen, auf der Ordinate die Skalenwerte der Extinktion aufgetragen. Die ausgezogenen Kurven entsprechen dem Absorptionsverhalten bei 234 μ , die gestrichelten dem bei 245 μ und die durch - - - - gekennzeichneten dem bei 283 μ . Es handelt sich in diesem Fall um die Extinktionswerte der unverdünnten Lösung. Die Werte über 100 sind errechnet. Die Abszisse dient gleichzeitig als Bezugssystem für die darunter liegenden Felder, die anzeigen, welche chemischen Nachweisreaktionen in den zugehörigen Röhrchen positiv sind (MICKE, ined.). Die nachgewiesenen Inhaltsstoffe der Fraktionen, bzw. die zu ihrem Nachweis benutzten Reagentien sind rechts angegeben. Die schwarz ausgezeichneten Felder kennzeichnen die Röhrchen mit maximalem Reaktionsausfall, während die schraffierten Flächen die geringeren Substanzkonzentrationen anzeigen. In den Röhrchen 8 - 10 finden sich die nichtgewanderten TMS-Bestandteile.

Abbildung 13

Absorptionsverhalten bei 234,245 und 283 μ u und chemische Nachweisreaktionen von Elektrophoresefraktionen aus TMS-B 251-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 29

Die stärkste Absorption liegt bei 234 μ u. Die Extinktionen der Röhrchen 1-11 sind für alle Röhrchen etwa gleich. Bei Röhrchen 9 befinden sich die Kohlehydrate. Obwohl ein Teil von ihnen ninhydrin-positiv ist, lässt sich photometrisch im Gegensatz zum Ultrakonzentrat des Stammes Tb 1⁺ kein gesteigertes Absorptionsverhalten messen. Bei beiden humanen Stämmen reagiert eine kathodisch (nach links) wandernde Substanz mit Ninhydrin. Sie liegt in diesem Versuch bei Röhrchen 2. Die als Protein A bezeichnete langsamste Proteinfraction (Röhrchen 13-16) enthält neben Eiweiss Nukleinsäuren und Lipide, deren Bereiche sich jedoch nicht völlig decken. Die sich daran anschliessende Fraction, das Protein B (Röhrchen 16-23), enthält Katalase und Peroxydase. Wie bei Stamm Tb 1⁺ ist die Indoxylacetat rasch und stark spaltende Esterase im Protein C (Röhrchen 24-25) enthalten. Im gleichen Protein befindet sich auch die Hauptmenge des nachgewiesenen Eisens.

Sowohl im Protein A wie im Protein B ist die Absorption bei 245 μ u meist niedriger als bei 283 μ u. Das Maximum von Protein B bei 234 μ u lag rechnerisch bei 749.



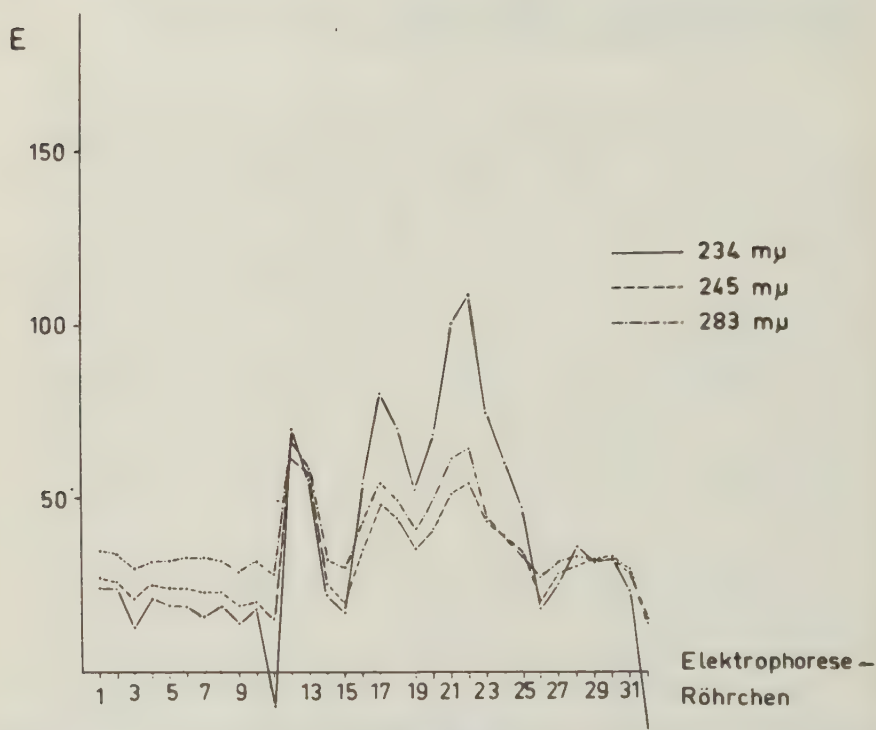
		Sulfosalicylsäure
		Kohlenhydrate
Versuch E 85		Nukleinsäure
	fragl.	Lipoide
		Eisen
		Ninhydrin
		Katalase
		Peroxydase
		Esterase

Abbildung 14

Absorptionsverhalten bei 234, 245 und 283 μ und chemische Nachweisreaktionen von Elektrophoresefraktionen aus TMS-F 245-UK, gewonnen aus den Stamm Tb 39

Die Kurven bei 245 und 283 μ zeigen einen im Wesentlichen gleichgerichteten Verlauf. Die höchsten Absorptionswerte wurden bei 234 μ registriert. Bei Röhrchen 11 liegt der Ableswert bei 234 μ unter der Nulllinie, d.h. die Probe hat eine schwächere Absorption als die Bezugslösung. Chemisch ist in diesem Bereich eine ninhydrin-positive Substanz nachweisbar. Im Einzelnen findet man: Bei Röhrchen 1-10 liegt kein Absorptionsmaximum, und auch die durchgeführten chemischen Nachweisreaktionen sind negativ. Bei Röhrchen 12 kommt bei allen drei Wellenlängen ein Absorptionsmaximum zur Aufzeichnung, dem sich chemisch die nichtwandernden Kohlehydrate zuordnen lassen. Bei Röhrchen 16-18 findet sich ein zweites Maximum für alle drei Wellenlängen mit den höchsten Extinktionswerten bei 234 μ . Chemisch lassen sich in diesem Bereich Eiweiße, Nukleinsäuren und Lipide nachweisen. Bei dieser Fraktion handelt es sich definitionsgemäß um das Protein A. Ein drittes und höchstes Maximum (Protein B) liegt für alle Wellenlängen im Röhrchen 22. Es fällt zusammen mit dem Maximum der Eiweißreaktion und des Katalase- und Peroxydase-nachweises. Auch die beiden benachbarten Röhrchen zeigen noch eine starke Reaktion auf Peroxydase. Eine Indoxylacetat spaltende Esterase ist im Röhrchen 24-26 nachweisbar, das Maximum dieser Reaktion liegt im Röhrchen 25 (Protein C). Es ist hier als " Schulter " der Protein-B-Fraktion angelagert. Für die vermehrte Absorption im Röhrchen 28 besteht chemisch noch kein Äquivalent.

UV - Absorption und chemische Nachweisreaktionen
von Elektrophoresefraktionen aus TMS - F 245 - UK (bov.)



Versuch	Ergebnis	Substrat
E 79		Sulfosalicylsäure
		Kohlenhydrate
		Nukleinsäuren
		Lipoide
	negativ	Eisen
		Ninhydrin
		Katalase
		Peroxydase
		Esterase

Abbildung 15

Absorptionsverhalten bei 234,245 und 283 m μ und chemische Nachweisreaktionen von Elektrophoresefraktionen aus TMS-F 249-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 4o

Im Gegensatz zum vorstehenden Versuch mit Ultrakon-
zentrat des bovinen Stammes Tb 39 findet sich hier keine
gesteigerte UV-Absorption im Bereich der Kohlehydratfraktion
(Röhrchen 10-13). Das Protein A (Röhrchen 14-18) ist in
diesem Fall der entsprechenden Fraktion des Stammes Tb 1⁺
ähnlicher als dem bovinen Stamm Tb 4o, da es keine Lipide
oder Nukleinsäuren enthält.

Aus der Verlaufsform der Protein-B-Kurve (Röhrchen
19-24) lässt sich bereits entnehmen, dass diese Fraktion
heterogen zusammengesetzt ist. Das Katalase- und Peroxydase-
maximum deckt sich völlig, überschneidet sich jedoch nicht
mit der Esterase des Protein C (Röhrchen 27). Zwischen
diesen drei Fermentmaxima liegt deutlich abgesetzt der ei-
senhaltige Fraktionsanteil. Ein färberisch mit Sudanschwarz
nachweisbares Lipoid scheint in sehr geringen Mengen im Pro-
tein B enthalten.

Abbildung 16

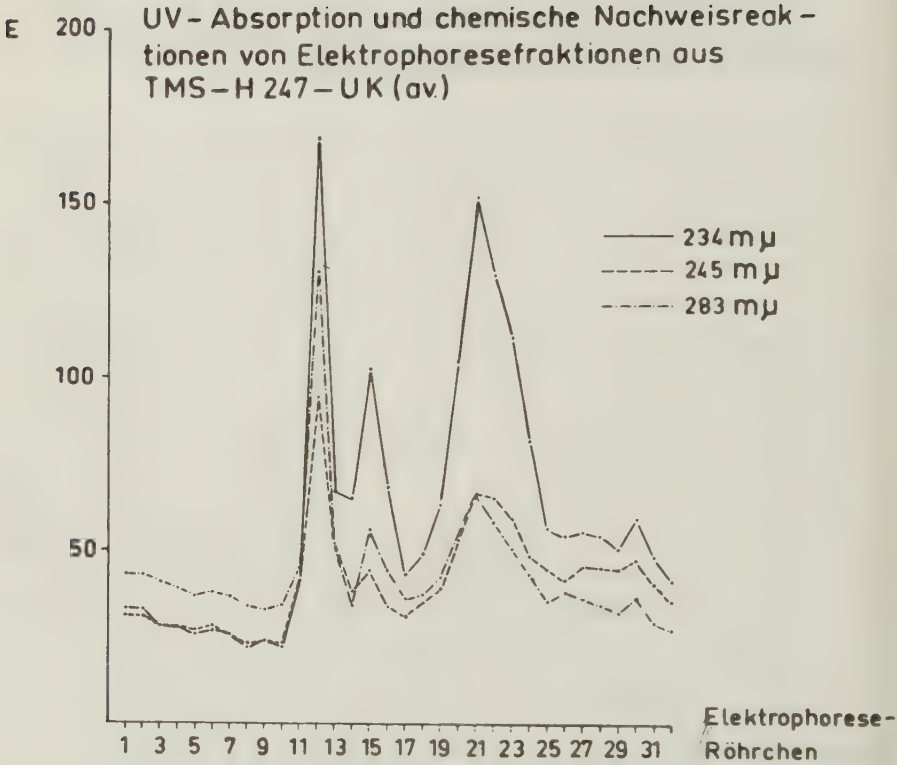
Absorptionsverhalten bei 234,245 und 283 μ und chemische Nachweisreaktionen von Elektrophoresefraktionen aus TMS-H 243-UK, gewonnen aus dem Stamm Tb 56

Bei der Tuberkulinmuttersubstanz H 243 vom Stamm Tb 56 entspricht der Verlauf von Röhrchen 1-9 dem des Stammes Tb 9 (vergl. Abb. 17). Die Kohlehydratfraktion liegt an der gleichen Stelle und entspricht in ihrem Absorptionsverhalten dem des Stammes Tb 9. Im Protein A bei Röhrchen 15 (14-16) findet man neben einer starken Sulfosalizylreaktion auch in diesem Fall Nukleinsäuren und Lipide. Im Protein B (Röhrchen 19-21) sind Eiweisse, Katalase, Peroxydase und Esterase enthalten, deren Maxima sich nicht völlig decken. Im Protein C (Röhrchen 22 und 23) finden sich neben Eiweissen reichlich Lipide, sowie eine eisenhaltige Substanz. Im Gegensatz zur humanen Tuberkulinmuttersubstanz enthält das Protein C keine Esterase; diese befindet sich hier vielmehr bereits im Protein B. Hier wird deutlich, dass die Reaktion auf eisenhaltige Substanzen nicht an eines der angeführten Fermente gekoppelt ist, zumal sie bei der Tuberkulinmuttersubstanz aus dem Stamm Tb 9 (vergl. Abb. 17) völlig fehlt. Auch bei dieser aviären TMS war die Ninhydrinreaktion negativ. Im Gegensatz zur TMS-H 247 (aviär) lässt sich hier photometrisch deutlich ein Protein C vom Protein B abgrenzen. Die beiden aviären Kulturfiltrate unterscheiden sich durch das Fehlen von Lipoiden und Eisen im Protein B und C in der TMS-H 247. Bei beiden aviären Ultrakonzentraten ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Esterase gegenüber der Katalase verzögert (vergl. hierzu humane und bovine Ultrakonzentrate). Der fehlende Eisennachweis im Versuch E 82 (TMS-H 247-aviär) könnte jedoch auf eine geringere Konzentration der Fraktion zurückgeführt werden, wie aus den unterschiedlichen Extinktionen zu ersehen ist. Auch hier findet man weiter anodisch (Röhrchen 28) eine nur durch geringe Absorption nachgewiesene Substanz.

Abbildung 17

Absorptionsverhalten bei 234,245 und 283 μ und chemische Nachweisreaktionen von Elektrophoresefraktionen aus TMS-H 247-UK (aviär), gewonnen aus dem Stamm Tb 9

Die Kurven bei 234,245 und 283 μ zeigen einen im Wesentlichen gleichartigen Verlauf. Die höchste Absorption wurde in der Regel bei 234 μ gemessen. Im Einzelnen findet man: Bei Röhrchen 1-10 liegt kein Absorptionsmaximum, die Extinktionswerte von 234 μ und 245 μ decken sich, während die Werte von 283 etwas höher liegen. Bei Röhrchen 12 schliesst sich ein Absorptionsmaximum bei allen drei Wellenlängen an, die niedrigsten Extinktionswerte liegen bei 245 μ . Nach den chemischen Nachweisreaktionen finden sich an dieser Stelle die nichtgewanderten Kohlehydrate. Bei Röhrchen 15 liegt ein weiteres Maximum für alle drei Wellenlängen und gleichzeitig eine starke Eiweisreaktion mit Sulfosalizylsäure. An der gleichen Stelle lassen sich färberisch geringe Mengen von Nukleinsäuren und Lipoiden nachweisen, sowie eine Indoxylacetat schwach spaltende Esterase. Diese dem Kohlehydrat benachbarte Fraktion ist definitionsgemäss das Protein A. Eine weitere Fraktion hat ihr Absorptionsmaximum bei Röhrchen 21 (Protein B und C), vergl. hierzu auch Abb. 12. Ihre Sulfosalizylsäurereaktion erstreckt sich von Röhrchen 18 bis 24 und ist am stärksten bei Röhrchen 21 und 22. In Röhrchen 21 und 23 findet man eine starke Katalasewirkung. In Röhrchen 21 deckt sie sich mit der Peroxydasereaktion. Die am stärksten in Röhrchen 19 bis 21 enthaltene Esterase überlagert sich hier teilweise mit der Peroxydase und einem Katalasemaximum. Der Eisennachweis mit Kaliumrhodanid war ebenso wie die Ninhydrinreaktion negativ. Für die Absorption in Röhrchen 30 besteht chemisch noch kein Äquivalent.



Versuch E 82		
		Sulfosalicylsäure
		Kohlenhydrate
		Nukleinsäuren
		Lipoide
	negativ	Eisen
	negativ	Ninhydrin
		Katalase
		Peroxydase
		Esterase

IV. B e s p r e c h u n g d e r E r g e b n i s s e

Wenn man die Abbildungen 1 bis 4 noch einmal insgesamt betrachtet, so kann man bei allen einen erheblichen Einfluss des Phenolzusatzes auf den Kurvenverlauf feststellen. Durch ihn erfolgt bei den untersuchten Aminosäuren eine Umwandlung der zweigipfligen Kurven in eine dreigipflige Form unter Verschiebung der Maxima zum langwelligen Teil. Gleichzeitig fällt auf, dass die Absorption im Bereich von etwa 280 μ in Relation zum kurzwelligen Maximum erheblich an Stärke zunimmt.

Der bekannte Kurvenverlauf der Ribonukleinsäure (RNS) mit stärkster Absorption bei 260 μ wird in Puffer mit Phenolzusatz (vergl. Abb. 4a) dahingehend verändert, dass zwei Maxima auftreten, davon eines bei 245 μ , das zweite bei 283 μ . Das in der gleichen Abbildung aufgeführte bovine Serumalbumin (BSA) liegt dagegen mit seinem Maximum bei 234 μ . Die Reihenfolge der Hauptmaxima dieser beiden Substanzen scheint durch den Phenolzusatz umgetauscht.

Die bei den TMS-Fraktionen erhaltenen Absorptionskurven gleichen in ihren einzelnen Abschnitten denen von Tyrosin, Tryptophan, Nukleinsäuren und bovinem Serumalbumin. Im Einzelnen ist jedoch nicht zu sagen, ob das Absorptionsverhalten einer Fraktion z.B. nur auf einem Tryptophangehalt beruht oder auf gleichzeitig mit Ribonukleinsäure vorhandenem Tyrosin. Durch entsprechende Mischungen der letztgenannten Substanzen könnte das Absorptionsverhalten durch Überlagerung dem von Tryptophan entsprechen. Die TMS-Ultrakonzentrate zeigen bei Lösung in destilliertem Wasser dem bovinen Serumalbumin ähnliche Absorptionsspektren. Ihre Maxima liegen jedoch bei 270 μ und weisen bei 275 μ eine geringe Schulter auf, während das Albuminmaximum sich bei 280 μ befindet. In Puffer gleicht das TMS-Ultrakonzentrat weitgehend dem Serumalbumin in Puffer. Seine Schulter bei 245 μ könnte, wie oben angeführt, sowohl auf einem Nukleinsäureanteil als auch z.B.

auf einem Tryptophananteil beruhen.

Die Ultrakonzentrate, sowie alle TMS-Proteine absorbieren verstärkt bei 234, 245 und 283 μ . Zur Abgrenzung der Fraktionen untereinander würden praktisch die Werte von 234 μ allein ausgereicht haben. Aus der Tatsache jedoch, dass die Extinktionswerte der drei Wellenbereiche nicht immer parallel zueinander aufsteigen oder abfallen, kann man manchmal auf eine heterogene Zusammensetzung benachbarter Fraktionsröhrchen schliessen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch die Hauptfraktionen nicht auf Grund der Verschiebung der Absorptionsrelationen von zwei Maxima weiter unterteilt.

Bei kontinuierlicher Messung der Ultrakonzentrate im sichtbaren Bereich liegt ein Absorptionsband zwischen 390 und 410 μ . Der gesamte an dieser Stelle absorbierende TMS-Anteil findet sich nach elektrophoretischer Zerlegung im Protein B wieder, bei aviärer TMS jedoch im Protein C (Abb. 10 b). Die im sichtbaren Bereich absorbierende Substanz scheint aber weder mit der eisenhaltigen Fraktion noch mit einem der Fermente identisch zu sein.

Die Kohlehydratfraktionen zeigen bei je einem humanen und bovinen Stamm (Abb. 13 und 15) auch bei hoher Konzentration nicht die sonst beim gleichen oder aviären Typ vorhandene charakteristische Absorption. Ihnen fehlen offenbar in starkem Masse die im Ultraviolett absorbierenden aromatischen Aminosäuren, während die Ninhydrinreaktion in unveränderter Weise stark positiv ist. Beim Stamm Tb 1⁺ wurde im Ultrakonzentrat selten Lipoid gefunden. Es wanderte in diesem Fall mit der schnellsten Proteinfraction (MICKE (34)). Demgegenüber ist bei den hier beschriebenen Kulturfiltraten der darin enthaltene Lipoidanteil teils nur in Protein A nachweisbar, teils auch gleichzeitig in Protein B oder C.

Zwischen aviären, bovinen und humanen Stämmen bestand kein typischer Unterschied in der Lage der Lipoidfraktion. Charakteristisch für beide untersuchten aviären Stämme war dagegen, dass deren Esterase eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber der Katalase hatte. Dieser Umstand

zwingt dazu, die Elektrophoresefraktionen nicht allein auf Grund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit für identisch zu erklären. Dazu sind weitere Kriterien notwendig, wie z.B. charakteristische chemische, serologische oder auch spektrophotometrische Eigenschaften. Auffällig ist bei den absorbierenden Kohlehydratfraktionen, dass deren Kurvenverlauf sehr stark dem von Tryptophan ähnlich ist. Bei Vergleichen von Infrarotspektren sollen typspezifische Unterschiede bei bestimmten, für diese Versuche aus den Bakterien extrahierten Lipoiden vorhanden sein (NOGUCHI (38a)).

Bei den vorstehenden Untersuchungen mittels der Ultraviolett-spektrophotometrie wurden zwar Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen festgestellt; sie waren jedoch nicht für die Mycobakterien typspezifisch. Unter den bei dieser Arbeit angewandten Versuchsbedingungen wurde keine Fraktion gefunden, deren Absorptionsverhalten dem früher von MICKE (34) beim Stamm Tb 1⁺ beschriebenen Protein A₂ entsprach.

V. Zusammenfassung

Es wurde das Absorptionsverhalten von Kulturfiltraten humaner, boviner und aviärer Tuberkelbakterien nach elektrophoretischer Zerlegung in unterschiedliche Fraktionen untersucht. Die von den verschiedenen Stämmen gewonnenen Absorptionskurven waren nicht typspezifisch. Innerhalb der Fraktion eines Stammes wichen die Kurven der Kohlehydrate auf der einen Seite von denen der Proteinfractionen auf der anderen Seite in deutlicher Weise ab. Wegen der quantitativen Unterschiede liessen sich die Proteinfractionen trotz gleichen qualitativen Verhaltens voneinander abgrenzen. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (MICKE (34)) konnte bei den jetzigen Stämmen keine dem Protein A_2 entsprechende Fraktion nachgewiesen werden. Eine Zuordnung von Kulturfiltraten oder deren Fraktionen zu einem bestimmten Mycobakterientyp erwies sich nur auf Grund ihres Absorptionsverhaltens im ultravioletten Bereich als nicht möglich.

Literaturverzeichnis

- 1 Anderson, R.J.: Separation of Lipoid Fractions of Tubercle
 Bacilli. J. Biol. Chem. (Balt.) 74, 525 (1927)
- 2 Anderson, R.J.: Chemistry of Lipoids of Tubercle Bacilli
 concerning so-called Tubercle Bacilli Wax.
 Analysis of purified Wax. J. Biol. Chem. (Balt.)
 83, 505 (1929)
- 3 Aronson, H. : Zur Biologie der Tuberkelbazillen.
 Berl. klin. Wschr. 484 (1898)
- 4 Asselineau, J.: Lipides du bacille tuberculeux.
 Adv. Tub. Res. 5, 1 (1952) S. Karger, Basel/
 New York
- 5 Asselineau, J., Lederer, E.: zitiert nach Stöckl, W.,
 Wien. Tierärztl. Monshr. 46, 812 (1959)
- 6 Ballowitz, L. : Tuberkulin-Diagnostik und -Therapie in der
 Pädiatrie. Berl. Med. 12, 155 (1961)
- 7 Beaven, G.H. : The Ultra-Violet-Absorptionsspectra of
 Proteins and Related Compounds. Adv. in
 Spectroscopy 2, 331 (1961)
- 8 Bendix, E. : Zur Chemie der Bakterien. Dtsch. med. Wschr.
 18-19 (1901)
- 9 Bevilaqua, E.B., McCarter, J.R.: The Proteins in unheated
 Culture filtrates of Human Tubercle Bacilli.
 I. Fractionation and Determination of
 physical-chemical Properties. J. exp. Med.
 87, 229 (1948)
- 10 Bloch, K. : Über phosphorhaltige Lipide aus humanen
 Tuberkelbazillen. Biochem. Z. 285, 372 (1936)

- 11 Bockemüller, W.: Arbeiten aus dem Paul-~~Ehrlich~~-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt/Main.
5-Jahres-Bericht 55, 36 (1957-61)
- 12 Bockemüller, W.; Oerter, A.: Die Zonenelektrophorese in Agargel als interferometrisches Verfahren. Klin. Wschr. 39, 371-80 (1961)
- 13 Boyden, S. V., Sorkin, E.: Antigens of Mycobacterium Tuberculosis. Adv. Tub. Res. 7, 17-51 (1956)
- 14 Daddi, G., Cattaneo, C.: zit. nach Seibert, F. B.
Progress in the Chemistry of Tuberculin. Adv. Tub. Res. 3, 17 (1950)
- 15 Edwards, L. B., Palmer, C. E.: Geographic Variation in naturally acquired Tuberculin Sensitivity. Lancet 1, 53 (1953)
- 16 Freerksen, E.: Zur Problematik der Allergie und Immunität bei der Tuberkulose. Berl. Med. 12, 87 (1961)
- 17 Göing, H., Micke, H.: Experimentelle Untersuchungen zur Immunbiologie der Tuberkulose. IV. Mitteilung. Über die antigenetische Zusammensetzung von Tuberkulinmuttersubstanz, Alt-Tuberkulin und gereinigtem Tuberkulin. Z. Immunforsch. 124, 315-24 (1962)
- 18 Götze, R.: in Weyl, A. Neue Wege zur Bekämpfung der Tuberkulose des Rindes. S. 40 ff.
Hannover 1950
- 19 Green, H. H.: zit. nach Hein, J., Kleinschmidt, H., Uhlinger, E., Handbuch der Tuberkulose Bd. I Allgemeine Grundlagen. S. 196 Stuttgart 1958

- 20 Hammerschlag, A.: Bakteriologisch-chemische Untersuchungen über Tuberkelbacillen. Sitzungsber. d. K. Acad. d. Wissensch., Dec. 1888 Zbl. klin. Med. 12, 9-18 (1891)
- 21 Hawkins, J. E., Thurston, J. R., Steenken, W.: The Effect of Filtration on Biologic Fluids. Am. Rev. Tbc. 84, 850-55 (1961)
- 22 Helmert, E.: Gepufferte Nährböden für Tuberkelbakterien. Z. Hyg. 140, 589-93 (1955)
- 23 Jensen, K. A., Lind, P.: Specificity of purified Tuberculin tested on Guinea Pigs. Acta tub. scand. 17, 37 (1943)
- 24 Jones, M. A., Larsen, A. B., Vardaman, Th., Baisden, L. A.: Studies on the Fractionation of Tuberculin and Johnin. I. Fractionation of Tuberculin Proteins. Am. Rev. Tbc. 68, 425-37 (1953)
- 25 Jones, M. A., Larsen, A. B., Vardaman, Th., Baisden, L. A.: Studies on the Fractionation of Tuberculin and Johnin. II. Extraction of Tuberculin Proteins with Phenol. Am. Rev. Tbc. 68, 437-43 (1953)
- 26 Jones, M. A., Larsen, A. B., Vardaman, Th., Baisden, L. A.: Studies on the Fractionation of Tuberculin and Johnin. III. Fractionation of Johnin Proteins. Am. Rev. Tbc. 68, 444-50 (1953)
- 27 Kasuga, T., Hagitani, N.: zit. nach Stöckl, W., Berl. Med. 12, 177 (1961)
- 28 Kent, P. W.: Structure of an Antigenic Polysaccharide isolated from Tuberculin. J. Chem. Soc. 364 (1951)
- 29 Kleinschmidt, H.: in Hein, J., Kleinschmidt, H., Uehlinger, E. Handbuch der Tuberkulose Bd. I Allgemeine Grundlagen S. 363. Stuttgart 1958

- 30 Kortüm, G. :Kolorimetrie und Spektralphotometrie, 2.Aufl., Berlin-Göttingen-Heidelberg 1948
- 31 Lind, A. :Serological Studies of Mycobacteria by means of Diffusion-in-gel techniques. IV. The precipitinogenic Relationship between different Species of Mycobacteria with special Reference to M.tuberculosis, M.phlei, M.smegmatis and M.avium. Int.Arch.Allergy 17, 300 (1960)
- 32 Lind, A. :Serological Studies of Mycobacteria by means of Diffusion-in-gel techniques. VII. Investigation of Precipitins demonstrated in various Preparations of mycobacterial Origin. Int.Arch.Allergy 19, 112-126 (1961)
- 33 Meissner, G. :zit.nach Zunker, M. Bundesgesundheitsblatt 5, 393 (1962)
- 34 Micke, H. :Experimentelle Untersuchungen zur Immunbiologie der Tuberkulose. I. Fraktionierung von Tuberkulinmuttersubstanz (TMS). Z.Immunforsch. 124, 224-39 (1962)
- 35 Micke, H. :Experimentelle Untersuchungen zur Immunbiologie der Tuberkulose. II. Untersuchung von Fraktionen aus Tuberkulinmuttersubstanz an Meerschweinchen. Z.Immunforsch. 124, 287-301 (1962)
- 36 Micke, H., Göing, H. :Experimentelle Untersuchungen zur Immunbiologie der Tuberkulose. III. Untersuchungen von Fraktionen aus Tuberkulinmuttersubstanz am isolierten Meerschweinchendarm. Z.Immunforsch. 124, 302-14 (1962)

- 37 Morikawa,K. :Experimental Study of the antigenical Diversity of Tuberculoprotein.
Jap.J.Tub.9,118 (1961)
- 38 Huser,R.,Massal,J.:Tuberkulose,Tuberkulinreaktion und Mykobakterien beim Pferd.Monhefte Tierheilk. 14,118-126 (1962) Abt.Rindertuberkulose und Rinderbrucellose.
- 39a Noguchi,Y. :Infrarotspektrophotometrie von Polysaccharidfraktionen,welche aus Tuberkulin und Candida albicans extrahiert wurden.
J.Kyoto prefect.med.Univ. 64,92o (1958)
- 39 Oprescu,C.C. :Sur la présence d'un antigène protecteur dans les bacilles tuberculeux.Rev. Immunol.Therap.Antimicrobienne 25,278 (1961)
- 4o Palmer,C.E.,Petersen,M.A.:Studies of pulmonary Findings and Antigen Sensitivity among Student Nurses.V.Doubtful Reactions to Tuberculin and to Histoplasmin.Publ.Health Rep. 65,1 (195o)
- 41 Palmer,C.E.,Petersen,M.A.:Studies of pulmonary Findings and Antigen Sensitivity among Student Nurses.VI.Geographic Differences in Sensitivity to Tuberculin as Evidence of Nonspecific Allergy.Publ.Health.Rep. 65,1111 (195o)
- 42 Palmer,C.E. :Tuberculinsensitivity and Contact with Tuberculosis.Am.Rev.Tbc. 68,678-94 (1953)
- 43 Paterson,R.C.:The Incidence and Causes of Tuberculin Reactions in Non-tuberculous Cattle.
Adv.Tub.Res. 7,1o1-129 (1956)

- 44 Pollok, T.M., Sutherland, J.D., D'Arcygart, P.: The
Specificity of the Tuberculin Reaction in
Man in Great Britain. Tubercle (Lond.)
40, 336 (1959)
- 45 Prigge, R., Döhmen, H.: Quantitative Untersuchungen über
die Wirksamkeit von Alttuberkulin (AT)
und gereinigtem Tuberkulin. Beitr. Klin.
Tbk. 100, 225-234 (1944)
- 46 Prigge, R. : Biochemie des Tuberkelbazillus und experi-
mentelle Chemotherapie der Tuberkulose.
Fiat-Reviews Bd. 43: Chemotherapie, S. 203-
254, Wiesbaden 1948
- 47 Prigge, R., Heymann, G.: Grundlagen und Möglichkeiten der
Tuberkuloseschutzimpfung. München-Berlin-
Wien 1957
- 48 Roulet, F., Brenner, M.: Die Chemie des Tuberkelbacillus.
Zbl. Tbk. 56, 193-320 (1943)
- 49 Roulet, F. : Der Tuberkelbacillus und das tuberkulöse
Granulom. Klin. Wschr. 27, 41 (1949)
- 50 Sandritter, W.: Das ultraviolette Absorptionsspektrum
der Proteine: Mikrospektrophotometrische
Methodik. Acta histochem. 4, 276-303 (1957)
- 51 Schauenstein, E.: Das UV-Absorptionsspektrum der Proteine.
Grundlagen und Grenzen der Auswertung.
Acta histochem. 4, 208-221 (1957)
- 52 Schuberth, H.: Untersuchungen über Sauton-Tuberkulin und
seine Reinigung. Z. physiol. Chem. 266, 225
(1940)
- 53 Schuster, D.: Versuche mit Tuberkulinen verschiedenen
Typus. Dtsch. med. Wschr. 46, 1102 (1920)
- 54 Seibert, F.B., Moreley, N.: The Relationship of the
Tuberculin Proteins of different acid-fast
Bacilli to Sensitization as indicated by

their Reactivity in sensitized Animals.
J.Immunol. 24,149 (1933)

- 55 Seibert,F.B.,Aronson,J.D.,Reichel,J.,Clark,L.T.,Long,
E.R.:Purified Protein Derivative.A
standardized Tuberculin for Uniformity
in Diagnosis and Epidemiology.Am.Rev.Tbc.
30,707-768 (1934)
- 56 Seibert,F.B.,Pedersen,K.O.,Tiselius,A.:Molecular Weight,
electrochemical and biological Properties
of Tuberculin Protein and Polysaccharide
Molecules.J.exp.Med. 68,413 (1938)
- 57 Seibert,F.B. :Removal of the Impurities,Nucleic Acid
and Polysaccharide,from Tuberculin Pro-
tein.J.Biol.Chem. 133,593-604 (1940)
- 58 Seibert,F.B. :The Chemistry of the Proteins of the
acid-fast Bacilli.Bacteriological Rev.
5,69-95 (1941)
- 59 Seibert,F.B. :History of the Development of Purified
Protein Derivative Tuberculin.Am.Rev.
Tbc. 44,1 (1941)
- 60 Seibert,F.B.,Glenn,J.T.:Tuberculin Purified Protein
Derivative.Preparations and Analyses of
a large Quantity for Standard.Am.Rev.Tbc.
44,9-25 (1941)
- 61 Seibert,F.B. :The Isolation of three different Proteins
and two Polysaccharides from Tuberculin
by Alcohol Fractionation.Their chemical
and biological Properties.Am.Rev.Tbc.
59,86-101 (1949)
- 62 Seibert,F.B. :Progress in the Chemistry of Tuberculin.
Adv.Tub.Res. 3,17-29 (1950)
- 63 Seibert,F.B. :Tuberculin Proteins in:The physical
Chemistry of Proteins.A general Discussion

of the Faraday Society.Nr.13 S.251 ff.
Aberdeen 1953

- 64 Seibert,F.B.,Figuerola,E.S.,Dufour,E.H.:Isolation,
Identification and Classification of
Proteins of Tuberculin and the Tubercle
Bacillus.Am.Rev.Tbc. 71,704 (1955)
- 65 Sorkin,E.,Boyden,S.V.:zit.nach Boyden,S.V.,Sorkin,E.,
Antigens of Mycobacterium Tuberculosis.
Adv.Tub.Res. 7,17-51 (1956)
- 66 Stöckl,W. :Die immunbiologischen und immunochemi-
schen Faktoren der Tuberkulinreaktion.
Wien.Tierärztl.Monschr. 46,812 (1959)
- 67 Stöckl,W. :Immunochemische Faktoren bei der Tuber-
kulinreaktion.Berl.Med. 12,177 (1961)
- 68 Stöckl,W.,Mathois,H.:Wirkung und Spezifität von Pepti-
den, isoliert aus Mycobacterium Tuberku-
losis.Monatshefte Tierheilkde. 14,113
(1962)
- 69 Stöckl,W.,Krocza,W.,Mathois,H.:Isolierung der tuberku-
linaktiven Proteine aus dem Tuberkulin
mit Hilfe von Dextran-Gel.Experientia
19,3 (1963)
- 70 Thurston,J.R.,Hawkins,J.E.,Steenken,W.:The Effect of
Filtration on Biologic Fluids.Am.Rev.
Resp.Dis. 82,77-81 (1960)
- 71 Weyl,A. :Neue Wege zur Bekämpfung der Tuberkulose
des Rindes.Hannover 1950.
- 72 Zunker,M. :Tuberkulose und Mykobakterien.Bundesge-
sundheitsblatt 5,393 (1962)

Herrn Professor Dr.Dr.h.c.R.Prigge möchte ich für die Themenstellung dieser Arbeit, Herrn Dr.med.H.Micke für seine freundliche Unterstützung und die Überlassung der elektrophoretischen Befunde herzlich danken.

L e b e n s l a u f

Am 18.1.1931 wurde ich, Marianne Hamacher geb. Traiser, als Tochter der Eheleute Josef Traiser und Margarete geb. Müller in Mainz am Rhein geboren. Nach 4jähriger Volksschul- ausbildung in meiner Heimatstadt Flörsheim/Main war ich Schü- lerin der Realgymnasien in Rüsselsheim und Nürnberg, sowie der privaten Mädchenrealschule Erlenbad bei Achern/Baden. Die Rei- feprüfung bestand ich im Jahre 1950 in Nürnberg. 1951 begann ich das Medizinstudium an der J.W.Goethe-Universität in Frank- furt/Main, wo ich am 19.11.1956 das Medizinische Staatsexamen ablegte. Nach 2jähriger Medizinalassistentenzeit am Stadt- krankenhaus Rüsselsheim und an dem Kinderkrankenhaus Eleono- renheim in Darmstadt erhielt ich ab 15.2.1959 die Bestallung als Ärztin. Von 1959 bis 1961 war ich als Stationsärztin auf der Inneren Abteilung des St.Vincenz- und Elisabeth-Hospitals in Mainz tätig. Anschliessend habe ich als wissenschaftliche Assistentin auf der experimentell-therapeutischen Abteilung des Paul-Ehrlich-Instituts in Frankfurt am Main (Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c.R.Prigge) gearbeitet und in dieser Zeit die Untersuchungen für meine Dissertation durchgeführt. Seit 1959 bin ich verheiratet und habe zwei Kinder.

Marianne Hamacher

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Prof.Dr.R.Altmann, Innere Medizin
Prof.Dr.W.Amelung, Innere Medizin
Prof.Dr.W.Artelt, Geschichte der Medizin
Prof.Dr.H.Betke, Arbeits- und Sozialhygiene
Prof.Dr.Blohmke, Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten
Prof.Dr.H.Cramer, Gynäkologie und Geburtshilfe
Prof.Dr.M.Czerny, Experimentalphysik
Prof.Dr.K.Felix, Physiologische Chemie
Prof.Dr.M.Gänsslen, Innere Medizin
Prof.Dr.O.Gans, Haut- und Geschlechtskrankheiten
Prof.Dr.A.Gebauer, Innere Medizin
Prof.Dr.R.Geissendörfer, Chirurgie
Prof.Dr.H.Giersberg, Zoologie
Prof.Dr.U.Graff, Chirurgie
Prof.Dr.E.Güntz, Orthopädie
Prof.Dr.W.H.Hauss, Innere Medizin
Prof.Dr.G.Heymann, Experimentelle Therapie
Prof.Dr.F.Hoff, Innere Medizin
Prof.Dr.P.Holtz, Pharmakologie
Prof.Dr.K.Jantz, Neurologie und Psychiatrie
Prof.Dr.G.Kahlau, Pathologie
Prof.Dr.P.Kramp, Humangenetik
Prof.Dr.W.Krücke, Neuropathologie
Prof.Dr.W.Kuhl, Zoologie
Prof.Dr.A.Lauche, Pathologie
Prof.Dr.Link, Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten
Prof.Dr.C.Montfort, Botanik
Prof.Dr.H.Naujoks, Gynäkologie und Geburtshilfe
Prof.Dr.R.Ortmann, Anatomie
Prof.Dr.R.Prigge, Experimentelle Therapie
Prof.Dr.B.Rajewsky, Medizinische Strahlenkunde
Prof.Dr.E.Rausch, Psychologie

Prof.Dr.J.v.Reckow,Zahn-,Mund und Kieferkrankheiten
Prof.Dr.P.Royen,Anorganische Chemie
Prof.Dr.B.de Rudder,Kinderheilkunde
Prof.Dr.W.Sandritter,Pathologie
Prof.Dr.W.Siede,Innere Medizin
Prof.Dr.H.Schlossberger,Bakteriologie und Hygiene
Prof.Dr.B.Schmith,Gesundheitsfürsorge
Prof.Dr.H.Schrade,Innere Medizin
Prof.Dr.A.W.Schwenzer,Gynäkologie und Geburtshilfe
Prof.Dr.D.Starck,Anatomie
Prof.Dr.G.K.Steigleder,Haut- und Geschlechtskrankheiten
Prof.Dr.F.Strnad,Röntgenologie und Strahlenheilkunde
Prof.Dr.R.Thiel,Augenheilkunde
Prof.Dr.E.Ungeheuer,Chirurgie
Prof.Dr.E.Vaubel,Innere Medizin
Prof.Dr.Weitz,Organische Chemie
Prof.Dr.K.Wezler,Physiologie
Prof.Dr.F.Wiethold,Gerichtsmedizin
Prof.Dr.J.Zutt,Neurologie und Psychiatrie

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel :

Über das Absorptionsverhalten von Kulturfiltraten humaner, boviner und aviärer Tuberkelbakterien nach elektrophoretischer Zerlegung in unterschiedliche Fraktionen

im Paul-Ehrlich-Institut, Staatliche Anstalt für experimentelle Therapie in Frankfurt am Main

unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. Prigge

mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. H. Mücke

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mananne Hamedee

Rüsselsheim, den 17.9.63

